

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS HENRIQUE PEREIRA

VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E SISTEMA NERVOSO
AUTÔNOMO EM RATOS: UM ESTUDO COM CORAÇÃO ISOLADO E
MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA IN VIVO



CURITIBA

2018

CARLOS HENRIQUE PEREIRA

VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E SISTEMA NERVOSO
AUTÔNOMO EM RATOS: UM ESTUDO COM CORAÇÃO ISOLADO E
MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA *IN VIVO*

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Fisiologia, no curso
de Pós Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias

CURITIBA
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Pereira, Carlos Henrique

Variabilidade da frequência cardíaca e sistema nervoso autônomo em ratos: um estudo com coração isolado e manipulação farmacológica *in vivo*. / Carlos Henrique Pereira. – Curitiba, 2018.
91 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Fernando Augusto Lavezzo Dias

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Frequência Cardíaca. 2. Sistema nervoso autônomo. I. Título II. Dias, Fernando Augusto Lavezzo. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 612



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **CARLOS HENRIQUE PEREIRA** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVADO do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 16 de março de dois mil e dezoito.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
APROVADO	Professor Doutor Jorge Vinícius Cestari Felix UFPR- Membro Titular	
APROVADO	Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça UFPR - Membro Titular	
APROVADO	Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora	



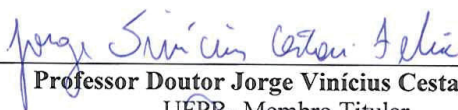
Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado de Carlos Henrique Pereira

Aos dezesseis dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito, foi realizada no auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação do mestrando **CARLOS HENRIQUE PEREIRA**, intitulada "**VARIABILIDADE DA FREQUENCIA CARDÍACA E SISTEMA NERVOSO AUTONOMO EM RATOS: UM ESTUDO COM CORAÇÃO ISOLADO E MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA *IN VIVO***". A abertura teve início às 08h00min pelo Presidente da Banca Examinadora e Orientador do candidato, Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias. O Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra ao aluno, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, o Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias passou à palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor Jorge Vinícius Cestari Felix do departamento de enfermagem da UFPR. Na sequência, passou à palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça do Departamento de Fisiologia da UFPR. O aluno respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, o Presidente, Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela "APROVADO", habilitando-o ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 16 de março de dois mil e dezoito.


Professor Doutor Jorge Vinícius Cestari Felix

UFPR- Membro Titular


Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça

UFPR - Membro Titular


Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias

UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo amor que me deram, além da educação, ensinamentos e apoio. Agradeço especialmente minha noiva, por sempre acreditar em minhas capacidades, e pelas conversas em horários pouco convencionais, afinal, não era fácil conversar estando a 8.000 quilômetros distância e quatro horas de diferença devido ao fuso horário.

Agradeço a todos os amigos do laboratório: Helena Zanella, Gislaine Bonete, Thabata Caroline, Diego Araujo, Andriele Capote, Eduardo Gomes, João Peixoto, Cláudio Rank, Edilaine Santos, Cibele Ribeiro, Anna Coutinho, Eduardo Pinheiro, Barbara Schneider. Vocês foram meus companheiros diários, dividiram as demandas e me confortaram mesmo quando os experimentos pareciam dar errado. Agradeço por todos os cafés que bebemos nesses dois anos. Foi muito mais fácil com a presença de vocês.

Durante o ensino médio, li uma frase de Mario Sergio Cortella. *O conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las.* Hoje acredito ainda mais nessa frase. Por isso, agradeço a todos os professores, pelos ensinamentos, dentro e fora da sala de aula. Especialmente a três professores, com quem tive maior contato durante o mestrado: Primeiramente ao meu orientador, Fernando Dias, que me recebeu com atenção e respeito no laboratório antes mesmo do meu ingresso como discente. Não consigo enumerar todas as coisas que aprendi com você durante nossas reuniões. A professora Ilana Kassouf, pelas conversas no laboratório e pela incrível aula de pressão arterial. E ao professor Rosalvo Fogaça, você sempre foi um modelo para mim, desde nossa primeira aula na disciplina “tópicos em fisiologia”.

Agradeço ao Buda primordial, pelo *Darma* Sagrado e a todos os companheiros do templo *Nyorenji*. O suporte que me deram foi essencial.

RESUMO

A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é um fenômeno fisiológico utilizado tanto como ferramenta para investigação do sistema nervoso autônomo (SNA) quanto um índice com valor prognóstico em diversas doenças. Apesar da quantidade de estudos realizados, em ratos, animal amplamente utilizado como modelo, tanto a VFC do coração isolado, recurso que pode ser utilizado para ajudar a elucidar a origem da VFC quanto a participação relativa de cada divisão do sistema nervoso autônomo, não foram extensamente estudadas. Com o objetivo de investigar a influência das divisões do SNA na VFC o presente estudo avaliou a VFC antes e após a administração de salina (placebo), atropina, propranolol, atropina e propranolol combinados, isoproterenol e ivabradina em 20 ratos Wistar, adicionalmente, avaliou a VFC em 20 corações isolados perfundidos pelo método de Langendorff. A análise com coração isolado incluiu a administração de isoproterenol em 16 corações. Após o bloqueio de receptores colinérgicos (atropina) e estimulação de receptores adrenérgicos (isoproterenol) houve aumento da frequência cardíaca (FC), enquanto o bloqueio de receptores adrenérgicos (propranolol) e bloqueio de corrente marca-passo (ivabradina) causou redução da FC, exercendo assim os efeitos esperados desses fármacos sobre a FC. A FC do coração isolado, assim como a FC, avaliada após atropina e propranolol combinados, é mais baixa que a FC basal, demonstrando um predomínio simpático de estimulação cardíaca basal *in vivo* em ratos. Tanto o bloqueio de receptores simpáticos quanto parassimpáticos causou redução em índices de variabilidade da frequência cardíaca global. Na análise de VFC no domínio frequência, tanto a baixa frequência (LF) quanto a alta frequência (HF) estão sob influência do ramo parassimpático, sendo mínima influência simpática em HF. A diminuição da atividade simpática no coração alterou de maneira mais intensa a banda LF e impactou o índice LF/HF, contudo, o aumento esperado desta banda em decorrência de hiperestimulação simpática não foi observada, sugerindo que o índice pode refletir com maior precisão alterações menores da estimulação simpática ou seu bloqueio, enquanto não apresenta especificidade para demonstrar estímulos de alta intensidade. Conclusão: Existe predomínio simpático de estimulação cardíaca basal *in vivo*, em ratos, com intensa influência do sistema nervoso autônomo sobre a variabilidade da frequência cardíaca. Os índices do domínio frequência LF e HF são influenciados pelo ramo parassimpático enquanto o bloqueio simpático influencia LF, porém a estimulação simpática parece não se refletir linearmente neste parâmetro.

Palavras-chave: Controle da frequência cardíaca, Sistema nervoso autônomo, coração.

ABSTRACT

Heart rate variability (HRV) is a physiological phenomenon used both as a tool for investigation of the autonomic nervous system and as an index with prognostic value of several diseases. In spite of the amount of studies conducted in rats, an animal widely used as a model, both the HRV of isolated heart, a resource that can be used to help elucidate the origin of HRV, and the relative participation of each division of the autonomic nervous system were not extensively studied. In order to investigate the influence of the SNA divisions on HRV the present study evaluated HRV before and after the administration of saline (placebo), atropine, propranolol, atropine and propranolol combined, isoproterenol and ivabradine in 20 Wistar rats, additionally, HRV was evaluated in 20 isolated hearts perfused using the Langendorff method. Isolated heart analysis included administration of isoproterenol to 16 hearts. After cholinergic blockade (atropine) and adrenergic stimulation (isoproterenol), there was increase in heart rate (HR), whereas adrenergic blockade (propranolol) and pacemaker current blockade (ivabradine) caused reduced HR, thus exerting the expected effects of these drugs on HR. HR of the isolated heart as well as HR assessed after combined atropine and propranolol, were lower than baseline HR, demonstrating a predominant sympathetic control of basal cardiac activity *in vivo* in rats. Both sympathetic and parasympathetic receptor blockade caused reduction in overall heart rate variability indexes. In the frequency domain analysis of HRV both low frequency (LF) and high frequency (HF) were under influence of the parasympathetic branch, with minimal sympathetic influence in HF. The decrease in sympathetic activity in the heart altered the LF band more intensely and impacted the LF / HF index, however, the expected increase in this band as a result of sympathetic hyperstimulation was not observed, suggesting that the index may reflect more accurately minor alterations of sympathetic stimulation or its blockade, while it does not present specificity to demonstrate high intensity stimuli. Conclusion: There is a predominant sympathetic control of basal cardiac activity *in vivo* in rats, with intense autonomic nervous system influence on heart rate variability. The frequency domain indexes LF and HF are influenced by the parasympathetic branch while sympathetic blockade influences LF, however, sympathetic stimulation does not appear to be linearly reflected in this parameter.

Key-words: Heart rate control, Autonomic nervous system, Heart.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURAS ANATÔMICAS DO CORAÇÃO	19
FIGURA 2 – ELETROCARDIOGRAMA	20
FIGURA 3 - INTERVALOS RR.....	22
FIGURA 4 - PLOT DE POINCARÉ.....	25
FIGURA 5 - MECANISMOS ENVOLVIDOS NO CRONOTROPISMO CARDÍACO ..	30
FIGURA 6 - ELETRODOS SUBCUTÂNEOS PARA ECG EM RATOS	38
FIGURA 7 - ELETROCARDIOGRAMA REALIZADO NO LABCHART.....	40
FIGURA 8 - INSPEÇÃO VISUAL DO TACOGRAMA	41
FIGURA 9 - ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - FREQUÊNCIA CARDÍACA ANTES E APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS	46
GRÁFICO 2 - SDNN APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS	47
GRÁFICO 3 - RMSSD APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS	48
GRÁFICO 4 - ALTERAÇÕES NO VLF APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS	48
GRÁFICO 5 - ALTERAÇÕES DO LF APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS.	49
GRÁFICO 6 - HF APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS	49
GRÁFICO 7 - LF/HF APÓS USO ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS	49
GRÁFICO 8 - LFNU E HFNU APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS.....	51
GRÁFICO 9 - VLF/TOTAL POWER APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS...	52
GRÁFICO 10 - LF/TOTAL POWER, HF/TOTAL POWER APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS	52
GRÁFICO 11 - COMPORTAMENTO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO CORAÇÃO ISOLADO.....	53
GRÁFICO 12 - SDNN E RMSSD NO CORAÇÃO ISOLADO	54
GRÁFICO 13 - ANÁLISE ESPECTRAL DO CORAÇÃO ISOLADO	55
GRÁFICO 14 - ANÁLISE ESPECTRAL DO CORAÇÃO ISOLADO, UNIDADES NORMALIZADAS E RAZÃO LF/HF	55
GRÁFICO 15 - VLF, LF E HF QUANDO NORMALIZADOS PELO TOTAL POWER	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DO TEMPO.....	84
TABELA 2 -	ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA.....	85
TABELA 3 -	ANÁLISE NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA QUANDO TOTAL POWER É CONSIDERADO.....	86
TABELA 4 -	ANÁLISE NÃO LINEAR DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	87
TABELA 5 -	ANÁLISE DA VFC DO CORAÇÃO ISOLADO NO DOMÍNIO DO TEMPO.....	88
TABELA 6 -	ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA DO CORAÇÃO ISOLADO NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA.....	89
TABELA 7 -	ANÁLISE NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA ONDE AS VARIÁVEIS SÃO EXPRESSAS COM RELAÇÃO AO TOTAL POWER.....	89
TABELA 8 -	ANÁLISE NÃO LINEAR DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA DO CORAÇÃO ISOLADO.....	90

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	JUSTIFICATIVA	16
1.2	OBJETIVOS	17
1.2.1	Objetivos gerais	17
1.2.1	Objetivos específicos	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	DO ELETROCARDIOGRAMA À VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	18
2.2	VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	21
2.3	VFC E O SNA	28
2.3	CORAÇÃO ISOLADO	33
3	MÉTODOS	37
3.1	ESTUDO PROSPECTIVO (FASE 1)	37
3.1.1	Preparação animal e implantação dos eletrodos	37
3.1.2	Administração dos fármacos	39
3.1.3	Eletrocardiograma e variabilidade da frequência cardíaca	40
3.2	ESTUDO RETROSPECTIVO (FASE 2)	43
3.2.1	Perfusão Retrograda de Langendorff (coração isolado)	43
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4	RESULTADOS	46
4.1	RESULTADOS DO ESTUDO PROSPECTIVO	46
4.2	RESULTADOS DO ESTUDO RETROSPECTIVO (CORAÇÃO ISOLADO)	53
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	APENDICE 1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA <i>IN VIVO</i>	84
	APENDICE 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA CORAÇÃO ISOLADO	88
	APENDICE 3 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	91

1. INTRODUÇÃO

O coração não funciona como um metrônomo, logo seus batimentos não possuem a regularidade de um relógio sendo normais e esperadas variações na frequência cardíaca. A essas alterações dá-se o nome de variabilidade de frequência cardíaca (VFC) que pode ser definida como a variação ao longo do tempo do período entre batimentos cardíacos consecutivos (ACHARYA et al., 2006; AUBERT et al., 2003; PUMPRLA et al., 2002; TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996; VANDERLEI et al., 2009).

A VFC reflete o controle, através dos aferentes e eferentes simpáticos e parassimpáticos, do sistema nervoso autônomo sobre o coração. (SAUL, 1990; AUBERT et al., 2003).

Há anos, existe o interesse pela compreensão dos seus mecanismos e de sua aplicabilidade clínica (VANDERLEI et al., 2009). Alta VFC é sinal de boa adaptação, caracterizando um indivíduo saudável com mecanismos autonômicos eficientes. Inversamente, baixa VFC é frequentemente um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA, o que pode indicar a presença de mau funcionamento fisiológico no indivíduo (PUMPRLA et al., 2002). Já foi demonstrado que a baixa VFC está associada ao aumento do risco de morte em pacientes com doença cardíaca crônica (NOLAN et al., 1998) e doença coronariana (DEKKER et al., 2000). A VFC também se encontra diminuída em pacientes com Diabetes Mellitus (KUDAT et al., 2006).

O eletrocardiograma ou outro método de análise de batimentos cardíacos, como os monitores cardíacos, é necessário para a obtenção de dados brutos para posterior análise da variabilidade da frequência cardíaca. Através do eletrocardiograma os intervalos R-R, intervalos esses que representam o período de tempo entre duas ativações elétricas e, conseqüentemente a dois batimentos cardíacos, podem ser calculados. São considerados intervalos RR normais os intervalos RR livres de batimentos ectópicos ou artefatos (VANDERLEI et al 2009). Existem várias formas de quantificar a VFC cardíaca sendo que as formas mais bem descritas são as análises no domínio do tempo e no domínio da frequência (AUBERT et al. 2003; VANDERLEI et al 2009).

Os índices estatísticos, análises no domínio do tempo, obtidos através de cálculos de intervalos RR normais são: o RR médio, que é a média de todos os intervalos RR normais; SDNN que corresponde ao desvio padrão de todos os intervalos RR normais; SDNNi, média dos desvios padrões dos intervalos RR normais calculados em intervalos de 5 minutos; SDANN, desvio padrão das médias dos intervalos RR calculados em intervalos de 5 minutos; RMSSD, raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais adjacentes ao quadrado; pNN50, percentual de intervalos RR normais que diferem mais que 50 milissegundos do seu adjacente. Em humanos, os índices RMSSD e pNN50 representam a atividade parassimpática (VANDERLEI et al 2009; AUBERT et. al., 2003; PUMPRLA et. al., 2002).

O método mais utilizado no domínio da frequência é o de análise espectral, que usualmente identifica oscilações em diferentes bandas de frequência. (RIBEIRO; MORAES FILHO, 2005). Tais oscilações podem ser classificadas, em humanos, como de alta frequência (HF: 0,15 a 0,4 Hz); baixa frequência (LF: 0,04 a 0,15 Hz); muito baixa frequência (VLF: 0,003 a 0,04 Hz) e ultrabaixa frequência, (ULF: 0 a 0,003 Hz). Segundo Novais et al., (2004) e Godoy et al., (2005) o significado fisiológico das bandas de frequência é: o componente de alta frequência (HF) corresponde à modulação respiratória e é um indicador de atuação do nervo vago sobre o coração; o de baixa frequência (LF) corresponde a ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração com predominância simpática. Os componentes VLF e ULF são menos utilizados e de explicação fisiológica não definida completamente. (NOVAIS et al., 2004; GODOY et al., 2005). O componente de baixa frequência é também associado a modulação autonômica através do barorreflexo (GOLDSTEIN et al., 2011).

Diversos procedimentos, que alteram a dinâmica do ramo parassimpático, influenciam diretamente a banda de alta frequência (HF), assim como outros índices de VFC descritos como indicadores de atividade parassimpática, como RMSSD e pNN50. Penttilla et al., (2001) observaram reduções da banda HF após administração de glicopirrolato, fármaco anticolinérgico, e após aumento da frequência respiratória. Conclui-se que o índice HF corresponde ao componente respiratório da VFC, respondendo, desta forma, a procedimentos que alterem a resposta vagal ao coração, como manobras respiratórias e drogas anticolinérgicas.

Estudos utilizando fármacos bloqueadores do ramo simpático e

parassimpático definem a banda LF como um índice que reflete a atuação tanto do sistema parassimpático como do sistema simpático. Nesses estudos a administração de um bloqueador muscarínico causava redução tanto de HF quanto de LF, enquanto que a administração de beta-bloqueador reduzia LF (BARBIER et al., 2006; APPEL et al., 1989). Entretanto esse índice tem sido alvo de discussão, uma vez que, Segundo Moraes et al., (2000) o mesmo parece não representar de forma apropriada a atividade do ramo simpático.

O índice VLF foi estudado por Taylor et al., (1998). Esses autores administraram, tanto na posição supina quanto durante o tilt-test, atropina, atenolol e Enalaprilat, fármaco que atua inibindo a enzima conversora da angiotensina, alterando, desta forma, o sistema renina-angiotensina. Foram observados, aumentos do VLF após administração de enalaprilat, diminuição após administração de atropina e aumentos durante a administração de atenolol. As alterações causadas pelo atenolol foram observadas apenas durante o supino e, segundo os autores, se deve ao aumento desordenadamente grande de apenas um dos participantes da pesquisa. Assim os autores concluíram que o VLF é influenciado pelo sistema renina-angiotensina, assim como pelo ramo parassimpático do SNA.

Apesar de existirem diretrizes padronizadas para análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca em humanos, em animais, especialmente ratos que são amplamente utilizados como modelos, tais parâmetros e sua representatividade relativa ao controle autonômico ainda não estão totalmente esclarecidas. Muitos autores usam os valores padronizados para humanos para interpretar dados animais, ou no sentido oposto, inferem alterações clínicas baseadas em alterações destes parâmetros em modelos animais (RONZHINA et al., 2010). Outra discussão pertinente relativa à análise espectral é a contribuição de cada divisão do sistema nervoso autônomo sobre os índices de VFC em ratos. Se por um lado o ramo parassimpático se mostra bem representado pelo índice de alta frequência, assim como por outros índices como RMSSD e SD1, o ramo simpático ainda carece de boa representação, sendo que a maior parte dos índices e recursos matemáticos que procuram representar sua atividade não se mostraram fidedignos da atividade simpática (MORAES et al, 2000; POLANCZYK et al., 1999).

Uma vez que a VFC é regulada pelo controle autonômico simpático e parassimpático sobre o coração (SAUL, 1990; AUBERT et al., 2003) pode-se investigar a atividade autônoma sobre o coração utilizando a administração de

agonistas e antagonistas dos receptores simpáticos e parassimpáticos (JAPUNDZIC et al.1990). Barbier et al. (2006) estudaram os efeitos do exercício físico nos receptores muscarínicos e adrenérgicos do coração. Para tanto foi administrado atropina, propranolol e atropina e propranolol combinados. Os pesquisadores observaram redução nas bandas de HF e LF após administração de atropina e atropina combinada com propranolol e redução das bandas LF após administração de propranolol. Estudos com coração isolado também mostram uma variabilidade da frequência cardíaca reduzida, porém existente, mesmo o coração sendo desnervado e não recebendo nenhum eferente simpático ou parassimpático nesta condição experimental (JANOUSEK et al., 2010; MUKHINA et al. 2000; FREY et al 1996).

Desde suas origens, o modelo de coração isolado tem se mostrado um recurso inestimável no desenvolvimento do entendimento da fisiologia do coração. A simplicidade da preparação, baixo custo, reprodutibilidade e a habilidade de estudar o órgão isolado de outros sistemas que possam influenciar em seu funcionamento são as principais vantagens do método. Diversas variáveis fisiológicas podem ser mensuradas com essa técnica, entre elas, com o uso de eletrodos adequados, o eletrocardiograma (BELL et al. 2011).

A necessidade de uma investigação sobre a modulação autonômica no coração se faz necessária, visto que, modificações nos índices de VFC somados aos sintomas clínicos podem indicar risco de morte aumentado. Apesar da grande quantidade de estudos publicados sobre variabilidade da frequência cardíaca, poucos estudos utilizaram a técnica de coração isolado (método de Langendorff), recurso que pode ser utilizado para determinar as bandas da análise espectral da VFC (RONZHINA et al., 2010) e ajudar a elucidar os mecanismos relativos à origem da VFC e ao controle autonômico sobre a VFC (JANOUSEK et al., 2010). Vários estudos também utilizaram bloqueadores simpáticos e parassimpáticos a fim de investigar seus efeitos na VFC (JAPUNDZIC et al.1990) e validar métodos de análise de variabilidade de frequência cardíaca em ratos não anestesiados (AUBERT et al., 1999). Entretanto, métodos que possibilitem melhor compreensão dos componentes simpáticos e parassimpáticos na VFC *in vivo*, utilizando os valores obtidos em análises de VFC no coração isolado, ainda não foram extensivamente explorados.

1.1 JUSTIFICATIVA

São vários os exemplos da aplicabilidade clínica e associação de índices da VFC com desfechos clínicos. Valores baixos de VFC estão associados a maior mortalidade em diversas doenças cardíacas (NOLAN et al., 1998; DEKKER et al., 2000). Em pacientes diabéticos a quantidade de complicações relacionadas ao diabetes, como retinopatia e neuropatia, está associada a menores valores de VFC (KUDAT et al., 2006). A baixa VFC pode ser observada após atividade mental estressora, tendo então, a VFC, o potencial de servir como indicador do nível de estresse e direcionar a necessidade de procedimentos preventivos a fim de reduzir enfermidades relacionadas ao estresse (TAELMAN et al., 2008). No meio esportivo a VFC demonstrou ser um instrumento para identificar atletas em risco de lesões por excesso de treinamento (MOUROT et al., 2004; PICHOT et al., 2002; WILLIAMS et al., 2017). Assim, a VFC é uma técnica útil, de baixo custo e de fácil execução para diversas áreas da saúde.

Apesar da quantidade de estudos publicados a respeito da VFC, alguns tópicos ainda não foram extensivamente explorados. Tem-se utilizado a VFC para determinar o balanço simpato-vagal em humanos, embora ainda existam lacunas de conhecimento sobre a influência autonômica individualizada de cada ramo do SNA nos índices de VFC

A representatividade do SNA nos índices da VFC, especialmente em ratos, amplamente utilizados como modelo para estudo de fisiologia e fisiopatologia, ainda carece de melhores definições. Ou seja, como cada ramo do SNA autônomo compõem os índices da VFC, especialmente a análise espectral. Este fato fica evidente, uma vez que, na literatura, não há consenso a respeito da atuação de cada ramo do SNA nos índices da análise espectral, especialmente relativo à atuação do ramo simpático (MORÃES et al., 2000) e, para ratos, são encontrados valores diferentes para as bandas de análise espectral (ALBERT et al., 1999; KUWAHARA et al., 1994; CAPOTE 2015; MANGIN 1998).

Por fim, a análise da VFC no coração isolado é um recurso que pode ajudar a elucidar os mecanismos de origem da VFC (RONZHINA *et. al.*, 2010; JANOUSEK *et. al.*, 2010). Essas análises permitem estudar a VFC intrínseca e como a mesma é alterada após manipulação farmacológica de forma isolada, ou seja, como o coração responde isolado de outros sistemas.

Assim, o presente estudo analisou a VFC, antes e após administração de fármacos agonista do SNA, antagonistas do SNA e bloqueadores parcial de corrente marca-passo cardíaca *in vivo*. Adicionalmente, comparou a VFC *in vivo* e do coração isolado, auxiliando na elucidação da atuação do SNA na VFC, em ratos, e o significado fisiológico dos índices da VFC.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

Analisar a variabilidade da frequência cardíaca antes e após o uso de fármacos que atuem no ritmo cardíaco modulando receptores adrenérgicos, colinérgicos e responsáveis pela corrente marcapasso cardíaca, assim como, comparar a VFC do coração isolado com a VFC *in vivo* e analisar a VFC no coração isolado antes e após a administração de isoproterenol.

1.2.1 Objetivos específicos

- a) Comparar, através de estudo retrospectivo, a VFC em animais sem sedação, sem restrição coma VFC em corações isolados dos mesmos animais.
- b) Comparar a VFC no coração isolado antes e após a administração de isoproterenol
- c) Comparar as alterações nos parâmetros de VFC após bloqueio de receptores muscarínicos e adrenérgicos, bloqueio parcial da corrente marcapasso cardíaca e uso de agonista simpático, em estudo prospectivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DO ELETROCARDIOGRAMA À VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

O coração é um órgão localizado no centro da cavidade torácica. É composto por quatro câmaras, sendo dois átrios e dois ventrículos (FIGURA 1). Os átrios recebem o sangue, vindo dos pulmões ou dos tecidos periféricos, e o conduzem até os ventrículos, estes irão bombear o sangue para a circulação sistêmica ou pulmonar. Na sequência de eventos mecânicos do ciclo cardíaco, os átrios se contraem antes dos ventrículos, de forma coordenada, sendo que o fluxo unidirecional do sangue é garantido devido a presença de válvulas que separam os átrios dos ventrículos (SILVERTHORN, 2010)

Eventos elétricos, potenciais de ação, precedem a contração dos átrios e ventrículos. Esses potenciais de ação são iniciados nas células do nodo sinusal, no átrio direito, se propagam para os átrios e para o nodo atrioventricular, onde tem sua velocidade reduzida, e então para o sistema de condução His-Purkinje e para os ventrículos (BERS, 2001).

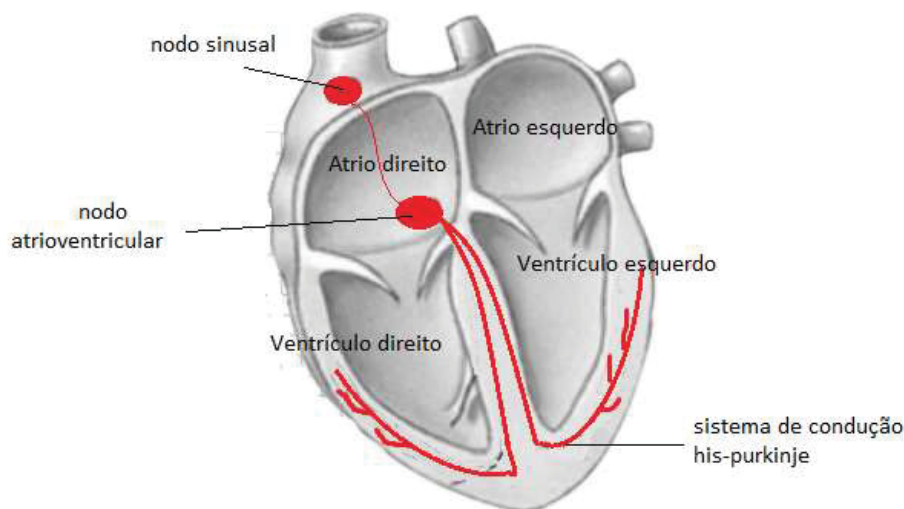
Os potenciais de ação que precedem a contração muscular podem ser registrados a partir do eletrocardiograma (FIGURA 2). O eletrocardiograma registra as variações de potencial elétrico na superfície do corpo permitindo inferir o curso dos eventos elétricos cardíacos e é representado por oscilações/ondas. A onda P decorre da despolarização atrial, o segmento PR da condução elétrica pelo nodo atrioventricular, o complexo QRS decorre da despolarização ventricular e a onda T da repolarização ventricular (KOEPPEN; STANTON, 2009).

Segundo Libby et al., (2010) diversos outros índices podem ser calculados por meio do ECG, para inferir sobre o funcionamento normal ou anormal do coração. Esses índices dizem respeito à duração, amplitude e morfologia das ondas. Alguns exemplos são:

- Aumentos da amplitude da onda R e aumento na duração do QRS podem indicar hipertrofia ventricular esquerda.
- Aumentos da duração do QRS, ondas R amplas e entalhadas, podem indicar bloqueios de ramo, ou seja, atrasos de condução intraventricular.

- Intervalo QT. Este é calculado do começo do complexo QRS ao final da onda T e decorre da despolarização e repolarização ventricular. Como este intervalo diminui em consequência a aumentos na frequência cardíaca, esse índice pode ser representado como QTc, ou seja, o intervalo QT corrigido pela frequência cardíaca.

FIGURA 1 - ESTRUTURAS ANATÔMICAS DO CORAÇÃO



FONTE: adaptado de Silverthorn (2010).

NOTA: O sistema de condução elétrico do coração está representado pelas linhas na cor vermelha

O ECG permite o cálculo da frequência cardíaca, pelo cálculo do intervalo de tempo entre despolarizações ventriculares, desta forma pode se inferir se o mesmo apresenta frequência normal, taquicardia ou bradicardia, permite diagnóstico de alterações de ritmo, uma vez que o funcionamento normal do coração depende da condução elétrica coordenada, e permite diagnóstico de diversas enfermidades cardíacas, como enfarto, por exemplo (DUBLIN, 1996).

O registro eletrocardiográfico de ratos é semelhante ao de humanos. As ondas P, complexo QRS e onda T decorrem dos mesmos fenômenos elétricos cardíacos. Entretanto algumas diferenças são notadas. Primeiramente, uma vez que a frequência cardíaca em ratos é maior que em humanos, a duração das ondas e intervalos é menor. Outra diferença é relativa a onda Q, de difícil localização em ratos, fazendo com que o intervalo QT seja calculado do começo da onda R até o final da onda T (KONOPELSKI E UFNAL, 2016). Além disso, há diferença marcante no segmento ST entre humanos e ratos. Valores de normalidade, para humanos e ratos, da duração das ondas do ECG estão apresentados no quadro 1.

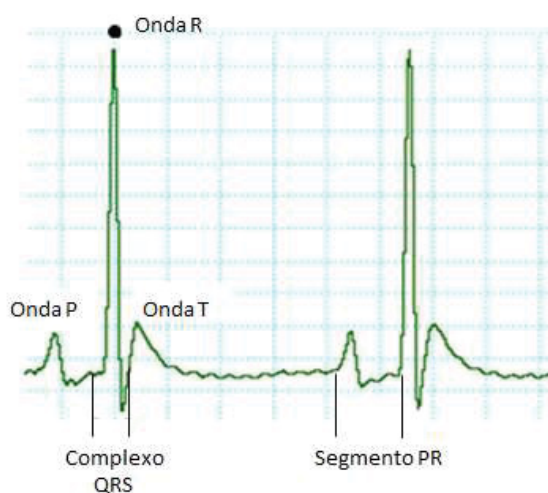
QUADRO 1 - VALORES DE NORMALIDADE DAS ONDAS DO ECG EM HUMANOS E RATOS

HUMANOS	
Onda ou intervalo	Duração
Onda P	<120 ms
Intervalo PR	120 a 200 ms
Complexo QRS	<110 a 120 ms
QTc	≤440 a 460 ms
RATOS WISTAR	
Onda ou intervalo	Duração
Frequência cardíaca	242 a 542 batimentos por minuto
Intervalo PR	39 a 78 ms
Complexo QRS	14 a 28 ms
QTc	133 a 173 ms

FONTE: Adaptado de Libby et al., (2010) e Konopelski E Ufnal (2016)

O cálculo da frequência cardíaca por meio do eletrocardiograma, em ratos, pode ser feito por meio do ECG, utilizando-se a fórmula: $FC = 60/RR$ em segundos (KONOPELSKI E UFNAL, 2016). O cálculo dos intervalos RR é necessários para a análise da variabilidade da frequência cardíaca (VANDERLEI et al., 2009).

FIGURA 2 – ELETROCARDIOGRAMA



FONTE: O autor (2018)
Nota: ECG realizado em rato.

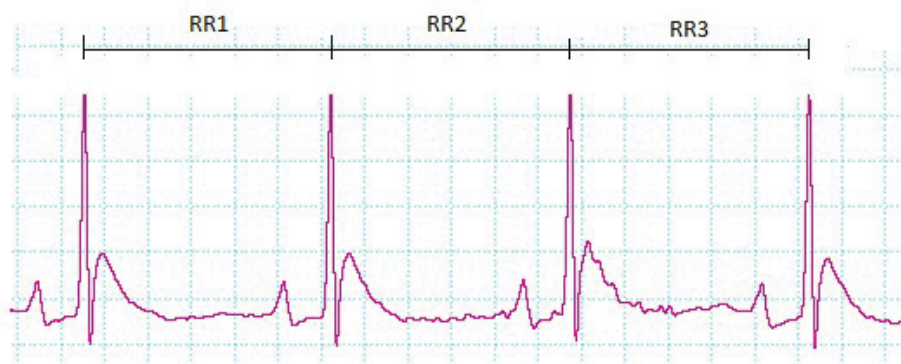
2.2 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Sabe-se que o coração apresenta variações no intervalo de tempo entre batimentos cardíacos, ou seja, os batimentos cardíacos não apresentam a regularidade de um relógio (VANDERLEI et al, 2009). A esse fenômeno, a variação ao longo do tempo do período entre batimentos cardíacos consecutivos, dá-se o nome de variabilidade da frequência cardíaca (ACHARYA et al., 2006; AUBERT et al., 2003; PUMPRLA et al., 2002; TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996; VANDERLEI et al., 2009).

É aceito que a variabilidade da frequência cardíaca seja causada pela atuação dos componentes do sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático. Alta variabilidade da frequência cardíaca é encontrada em indivíduos saudáveis, demonstrando assim bom controle autonômico e baixa variabilidade da frequência cardíaca, pode ser encontrada em indivíduos não saudáveis, indicando disfunção do controle autonômico (VANDERLEI et al, 2009).

A VFC pode ser calculada através do eletrocardiograma (ECG). Esse pode ser coletado por diversos métodos, como o uso de eletrocardiógrafos e frequencímetros (VANDERLEI et al, 2009). O intervalo de tempo entre duas ondas R, ou intervalo RR (FIGURA 3), deve ser mensurado e através destes intervalos os índices de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) podem ser calculados (VANDERLEI et al, 2009). Desta forma, a VFC pode ser descrita também como a variação ao longo do tempo entre intervalos RR consecutivos (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996; VANDERLEI et al., 2009).

FIGURA 3 - INTERVALOS RR



FONTE: O autor (2018)

NOTA: intervalos RR são calculados através do eletrocardiograma onde o período de tempo entre duas ondas R, onda de maior intensidade do complexo QRS do eletrocardiograma que se deve a despolarização ventricular.

Vários são os métodos de análise das variações dos intervalos RR. Esses podem ser classificados em índices calculados no domínio do tempo e índices calculados no domínio da frequência (PAPAIOANNOU et al, 2013). É possível classificar os métodos de análise da variabilidade da frequência cardíaca em métodos lineares e métodos não lineares (MANSIER et al, 1996). Antes do cálculo dos índices de variabilidade de frequência cardíaca os intervalos RR são passados por filtros e editados, a fim de extrair batimentos ectópicos e artefatos. Após a extração dos batimentos ectópicos e artefatos, os intervalos RR são chamados de intervalos RR normais, ou intervalos NN (VANDERLEI et al, 2009).

Os parâmetros no domínio do tempo podem ser divididos em: métodos estatísticos e métodos geométricos. Nos métodos estatísticos as variáveis mais comuns são: a média dos intervalos NN; SDNN, o desvio padrão dos intervalos NN; RMSSD, raiz quadrada do quadrado das diferenças entre batimentos cardíacos consecutivos; NN50, número de intervalos NN com duração maior que 50 milissegundos; pNN50, proporção derivada da divisão do NN50 pelo número total de intervalos NN (PAPAIOANNOU et al, 2013; TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996).

Nos métodos geométricos é possível realizar a visualização gráfica dos intervalos NN como histogramas de densidade, gráficos de coordenadas cartesianas e deles extraindo as variáveis de variabilidade da frequência cartesiana. Os índices mais comuns são: o índice triangular, que representa a base do histograma de densidade dos intervalos RR dividida pela frequência modal e o Plot de Poincaré,

que é um mapa de pontos em coordenadas cartesianas onde um intervalo RR é plotado em relação ao intervalo RR seguinte (RASSI JR, 2000).

Para realizar as análises no domínio da frequência, o tacograma, representação gráfica dos intervalos RR ao longo do tempo, sinal oriundo da série temporal por meio de algoritmos matemáticos, é decomposto em ondas de frequência de mais simples interpretação, cuja unidade é Hertz. A esse procedimento se dá o nome de análise espectral, (RASSI JR, 2000). A análise espectral quantifica a variância dos intervalos RR, ou potência total expressa em milissegundos ao quadrado, dentro de cada banda de frequência (STEIN et al., 1994). A transformação rápida de Fourier (FFT) é o método de análise espectral mais utilizado (MANSIER et al, 1995).

Após a aplicação de métodos matemáticos para realizar a análise espectral três bandas de frequência são possíveis de se distinguir. Essas são: VLF - (very low frequency) banda de frequência muito baixa, LF - (low frequency) banda de baixa frequência, HF (high frequency) - banda de alta frequência. Em gravações eletrocardiográficas de longa duração, como Holter de 24 horas, é possível detectar uma onda de frequência ultra baixa (ultra low frequency) - ULF (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996). As bandas da análise espectral estão entre as seguintes frequências no humano: ULF até 0,0033Hz; VLF, 0,0033 até 0,04Hz; LF, de 0,04 até 0,15HZ e HF, de 0,15 até 0,4HZ (STEIN et al., 1994).

Os valores das bandas da variabilidade da frequência cardíaca supracitadas são valores de referência para humanos, para animais tais valores ainda não estão bem definidos (RONZHINA et al 2010). Aubert et al. (1999) conduziram um estudo para avaliar a VFC em ratos não anestesiados e sem restrição de movimento, para validar os componentes espectrais. Neste estudo foram administrados propranolol e atropina, fármacos bloqueadores dos ramos simpático e parassimpático, sendo definidos dois componentes de frequência, o de baixa frequência (0.19 – 0.74 Hz) e o de alta frequência (0.78 – 2.5 Hz). Em estudo similar Kuwahara et al., (1994) definiram as seguintes bandas de frequência para ratos: LF entre 0.04 e 1.0 Hz e, HF entre 1.0 e 3.0 Hz. Entretanto, outros valores são comumente utilizados: 0,2 a 0,75 Hz para a banda de baixa frequência e 0,75 a 3 Hz para a banda de alta frequência (FORTES 2010; CAPOTE 2015) e 0,2 a 1 Hz para a banda de baixa

frequência e 1 a 3 Hz para a onda de alta frequência (MANGIN et al., 1998).

Uma vez que sinais biológicos apresentam comportamento não estacionários, foi reconhecido que a modulação da VFC também apresenta comportamento não linear. Dessa forma, várias metodologias foram propostas para a análise não linear da VFC (ACHARYA et al., 2002). Esses métodos são normalmente referidos como teoria do caos. Essa teoria considera os sistemas como fenômenos complexos e caóticos, desta forma, não são considerados lineares. As análises relativas a teoria do caos, inferem a respeito do comportamento e previsibilidade de um sistema. Na análise da VFC, segundo essa teoria, maior complexidade e imprevisibilidade da VFC está associada a mecanismos autonômicos eficientes (GOLDBERG, 1996).

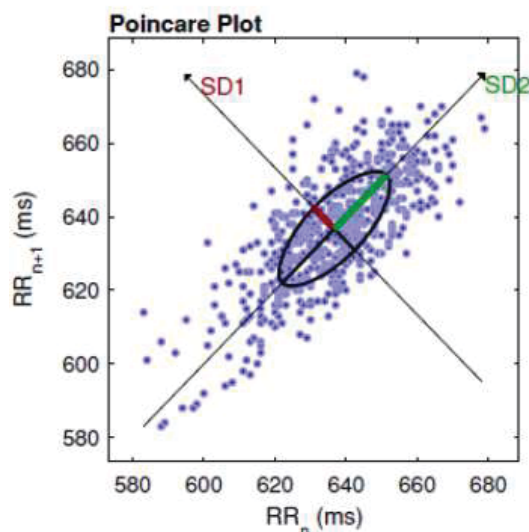
Dos diversos métodos utilizados, a análise destendenciada das flutuações (DFA), Expoente de Lyapunov, Entropia (GERMAN-SALÓ; GERMAN-SALÓ, 2016), índices do Plot de Poincaré (HOSHI et al., 2013) são os mais utilizados.

A análise destendenciada das flutuações é usada para calcular o índice de fractalidade dos sinais temporais (HOSHI et al., 2013). Dois índices são calculados através desse método, o DFAa2 e DFAa1, este mais bem estabelecido e com boa aplicabilidade clínica devido a seu poder preditivo de mortalidade, reflete o nível de aleatoriedade de uma série temporal. O índice DFAa1 foi considerado melhor preditor de mortalidade do que os índices convencionais de variabilidade de frequência cardíaca em um estudo que acompanhou por quatro anos 193 pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio e apresentavam função ventricular esquerda diminuída (MAKIKALLIO et al., 1999).

O plot de Poincaré também chamado de mapa de retorno, é um método para representar graficamente a estrutura dos intervalos RR (FIGURA 4). Nesse método o formato apresentado pode distinguir pacientes normais (distribuição em forma de cometa) de pacientes com enfermidades como, por exemplo, insuficiência cardíaca (distribuição em forma de torpedo) (STEIN; REDDY, 2005).

Entretanto o plot de Poincaré não é apenas uma ferramenta qualitativa, pois índices de VFC podem ser calculados após ajustar uma elipse na distribuição dos intervalos RR apresentados graficamente. Dessa forma, três índices são calculados, o SD1 representando as mudanças a curto prazo dos intervalos RR, SD2 representando as mudanças a longo prazo dos intervalos RR e o SD2/SD1 representando a relação entre essas duas medidas (HOSHI et al., 2013).

FIGURA 4 - PLOT DE POINCARÉ



FONTE: O autor (2018)

Nota: Plot de Poincaré construído com o software Kubius.

Historicamente, o interesse clínico pela variabilidade da frequência cardíaca data de 1965 quando Hon e Lee notaram que o sofrimento fetal era precedido de alterações nos intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos antes mesmo de haver alguma alteração significativa na frequência cardíaca propriamente dita, a partir dessa data, diversos pesquisadores associaram alterações entre intervalos RR à presença de diversas enfermidades (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996).

Dekker et al. (2000) em um estudo de coorte, composto por homens e mulheres de meia idade concluíram que alta frequência cardíaca e, principalmente, baixa variabilidade da frequência cardíaca foi um preditor de mortalidade aumentada, sendo que alterações na VFC precedem o aparecimento da doença. O autor conclui que a VFC é um indicador mais sensível, para relatar danos autonômicos relacionados a presença do diabetes, que a frequência cardíaca.

Nolan et al. (1998) em um estudo prospectivo com 433 pacientes com insuficiência cardíaca crônica, durante um período de 482 ± 161 dias, concluíram que a taxa de mortalidade é maior em pacientes com menor VFC e que a VFC é um sensível indicador de mortalidade. Nesse estudo o risco de mortalidade anual para indivíduos com o índice SDNN maior que 100 ms foi de 5,5%, para indivíduos com SDNN entre 50 e 100 ms foi de 12,7% e para indivíduos com SDNN menor que 50

ms foi de 51,4%.

Schroeder et al. (2005) investigaram as consequências do diabetes mellitus na variabilidade da frequência cardíaca. O estudo analisou a mudança na VFC durante nove anos. O estudo concluiu que indivíduos diabéticos tinham um decréscimo maior da VFC comparado com indivíduos não diabéticos, o índice SDNN apresentou decréscimo de 0,65 ms/ano (0,69 a 0,61 - intervalo de confiança de 95%) para indivíduos com glicemia em jejum em valores normais contra 0,95 ms/ano (1,09 a 0,81) em indivíduos diabéticos, para o índice RMSSD, os valores foram de 0,35 (0,39 a 0,30) contra 0,66ms/ano (0,82 a 0,51).

Malpas e Maling (1990) avaliaram a VFC de 11 indivíduos controle 12 indivíduos diabéticos com disfunção autonômica e 13 indivíduos diabéticos sem disfunção autonômica. A avaliação de disfunção autonômica foi realizada por meio dos testes de Ewing. Os dois grupos diabéticos apresentaram SDNN menores que o grupo controle, sendo que o grupo com disfunção autonômica apresentou os menores valores de VFC. Não houve diferença nos testes de Ewing entre o grupo controle e o grupo diabético sem disfunção autonômica sugerindo que a VFC é um indicador mais sensível da função autonômica em pacientes diabéticos.

Kudat et al. analisou a VFC de 31 pacientes diabéticos, pareados por idade e sexo com grupo controle, com e sem complicações causados pelo diabetes. Os pacientes diabéticos apresentaram menores valores para os índices de variabilidade de frequência cardíaca quando comparados com os controles. Entre os pacientes diabéticos, os menores valores de VFC foram encontrados nos pacientes com maiores complicações causados pelo diabetes como nefropatia e retinopatia.

Diversas outras enfermidades e condições fisiológicas podem ser analisadas utilizando a análise da VFC. Karason et al., 1999 estudou a VFC de pacientes obesos. Nesse estudo os pacientes foram separados em três grupos, o grupo controle composto por indivíduos sem obesidade, grupo que passaria por cirurgia para redução do peso corporal e um grupo que recebeu recomendações dietéticas para redução do peso. Os grupos obesos apresentaram menor VFC com relação ao grupo controle. Após um ano de *follow up* os grupos obesos foram reavaliados. O grupo que foi submetido a cirurgia perdeu em média 32 quilos e apresentou aumento da VFC enquanto o grupo que recebeu recomendações nutricionais não apresentou alterações no peso e na VFC.

A VFC reduzida também tem sido descrita em alguns grupos com doença

pulmonar obstrutiva crônica (ROQUE et al., 2014), indivíduos com maior estresse percebido (SILVA et al. 2015), atletas submetidos a overtraining (MOUROT et al., 2004; PICHOT et al., 2002; WILLIANS et al., 2017).

Segundo PAPAIOANNOU et al., (2013) três teorias discutem o fato da VFC estar reduzida em diversas enfermidades:

A primeira foca na redução do tono vagal. Segundo Cooper et al., (2015) a atividade do sistema parassimpático, através da atividade do nervo vago, tem um importante papel na regulação da inflamação e pode ser demonstrada uma relação inversamente proporcional entre a VFC e os níveis de diversos marcadores inflamatórios como fibrinogênio, interleucina 6 e proteína C reativa, mostrando, desta forma, a influência do sistema nervoso autônomo na resposta anti-inflamatória. Gonçalves (2014) em uma revisão de literatura, descreve a influência do SNA autônomo na resposta inflamatória da sepsis. Nessa revisão, o autor conclui que os ramos simpático e parassimpático atuam de forma sinérgica, regulando a resposta imune localizada no baço, e que novas possibilidades terapêuticas, como administração de agonistas beta – 2 ou de receptores nicotínicos, podem ser realizadas para tratamento da sepsis.

Os estudos supracitados corroboram com a revisão de literatura de Haensel *et al.*, (2008) que mostra haver correlação inversa entre índices de variabilidade da frequência cardíaca e marcadores inflamatórios, tanto em pessoas saudáveis como em pacientes com doenças cardiovasculares.

A segunda teoria afirma que na fisiologia existem propriedades de forma fractal com um alto nível de complexidade. Um fractal, por conceito, é o sistema que apresenta auto semelhança ou similaridade de escala, ou seja, uma parte desse sistema será semelhante ao sistema como um todo. Essa complexidade explica fenômenos como a variabilidade da frequência cardíaca, sendo que a presença de uma doença faria com que o sistema perdesse a complexidade (GOLDBERGER *et al.*, 2002). Um exemplo de sistema com organização fractal é o sistema pulmonar. A árvore brônquica pode ser vista como uma sequência ou redes de ductos que se dividem dicotomicamente em ductos cada vez menores (MORÃES, 2007)

Uma terceira teoria foca na origem intracardíaca da variabilidade da frequência cardíaca, onde a heterogeneidade eletrofisiológica das células do nodo sinusal traduz e amplifica sinais que chegam ao coração e durante diversos estados patológicos essas células estariam em um meio metabolicamente desfavorável que

podem afetar a funcionamento de diversos canais iônicos (PAPAIOANNOU *et al.*, 2013).

2.3 VFC E O SNA

A homeostase cardiovascular, ou seja, a manutenção de variáveis como a pressão arterial e frequência cardíaca, batimento a batimento, dentro de valores estreitos, é controlada através do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático (SAUL, 1990). Até mesmo em condições de repouso a frequência cardíaca responde ciclicamente ao sistema nervoso autônomo (KLEIGER *et al.*, 2005). Desta forma é aceito que o sistema nervoso autônomo seja o responsável pela VFC (VANDERLEI *et al.*, 2009).

A inervação simpática é presente em todo o coração (nodo sinusal, nodo átrio ventricular, septos, feixe de His, fibras de Purkinje, músculo atrial e ventricular). A inervação parassimpática concentra-se nos nodos sinusal e atrioventricular e átrio, com pouca inervação ventricular (AIRES, 2008). O sistema nervoso autônomo no coração atua através dos neurotransmissores noradrenalina e acetilcolina, ambos têm capacidade de alterar o débito cardíaco, tanto através da contratilidade cardíaca, frequência cardíaca e através de tônus ao músculo liso vascular. O controle autonômico para o coração é feito por eferentes parassimpáticos ao coração e simpático ao coração e vasos, e envolve três arcos reflexos característicos, mediados por: pressorreceptores arteriais sensíveis a deformações na parede vascular, receptores cardiopulmonares ativados por mudanças de pressão nas câmaras cardíacas, e os quimiorreceptores arteriais sensíveis a mudanças na pressão parcial dos gases e pH. Assim como a variabilidade da frequência cardíaca a sensibilidade do sistema barorreflexo é considerado um preditor de risco de morte após evento cardiovascular (MOSTARDA *et al.*, 2010).

O aumento da frequência cardíaca através do ramo simpático deve-se à diminuição da permeabilidade ao potássio que ocasiona um aumento na velocidade de despolarização da membrana das células do nodo sinusal. O sistema parassimpático atua diminuindo a frequência cardíaca através do aumento da permeabilidade do íon potássio, o que causa hiperpolarização da membrana, o sistema parassimpático possui pouco efeito direto na contratilidade (AIRES, 2008).

No nodo sinoatrial o sistema parassimpático, através da ação da acetilcolina,

age também sobre a corrente ativada por despolarização alterando sua ativação para valores mais negativos e reduzindo sua atividade, este fenômeno pode ser inibido por atropina, indicando que esse efeito é mediado pelo receptor muscarínico (DIFRANCESCO; TROMBA, 1988).

No sentido oposto o sistema nervoso simpático, cuja ação é aumentar a frequência cardíaca, aumenta a corrente lenta de influxo (I_{CaL}), por meio dos canais de cálcio do tipo L, no nodo sinoatrial (BROWN; DIFRANCESCO; NOBLE, 1979).

Os mecanismos envolvidos tanto no cronotropismo cardíaco, tanto pelo ramo simpático quanto pelo ramo parassimpático do SNA (FIGURA 5) atuam por mecanismos dependentes de AMPc e da proteína quinase A (PKA), onde um agonista colinérgico ou adrenérgico se liga a um receptor acoplado à proteína G, então adenil ciclase (AC) é ativada (estímulo adrenérgico) ou inativada (colinérgico). AC gera AMPc que controla a atividade da PKA, esta fosforila vários alvos dentro da célula resultando na taxa de disparos de potenciais espontâneos (BEHAR et al., 2016).

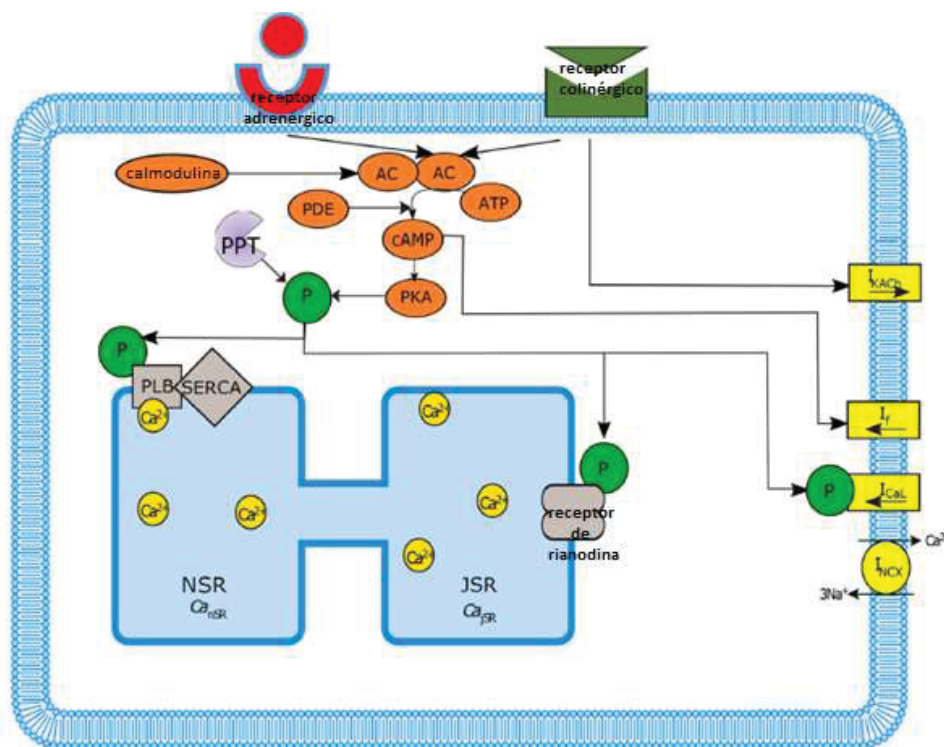
O SNA também atua, no sistema cardiovascular, controlando a pressão arterial, mantendo-a em níveis estreitos. Esse mecanismo, chamado de controle do barorreflexo, depende da deformação causada aos barorreceptores, da integração do sistema de controle cardiovascular, especialmente o núcleo ambíguo, núcleo do trato solitário, bulbo ventro lateral rostral e bulbo ventro lateral caudal e dos eferentes simpáticos e parassimpáticos (SILVA, 2015).

Aumentos na pressão arterial irão aumentar a atividade do ramo parassimpático assim como diminuir o ramo simpático do SNA a fim de diminuir a frequência cardíaca e contratilidade do miocárdio. De forma contrária, diminuições da pressão arterial aumenta a frequência cardíaca, a contratilidade do miocárdio e a resistência vascular (LANFRANCHI; SOMERS, 2002).

O bulbo é considerado a principal região de controle do sistema cardiovascular, sua integração compreende grupamentos neuronais responsáveis tanto pelo tono vagal como núcleo ambíguo (NA), núcleo dorsal motor do vago (DMV), núcleo do trato solitário (NTS) e áreas responsáveis pelo tono simpático como o bulbo ventro-lateral rostral (BVLr). Durante aumentos de pressão arterial as informações dos barorreceptores chegam ao NTS, esses neurônios se projetam ao NA e ao DMV aumentando o tono vagal, alguns neurônios do NTS excitam neurônios do bulbo ventro lateral caudal (BVLc) que por sua vez inibem o BVLr

causando consequente diminuição do tono simpático. De forma oposta, diminuições na pressão arterial diminuem o número de aferentes ao NTS, logo os NA e DMV menos estimulados causam diminuição do tono vagal e aumento do tono simpático uma vez que o BVLc não estimulado não tem função inibitória no BVLr (AIRES, 2008).

FIGURA 5 - MECANISMOS ENVOLVIDOS NO CRONOTROPISMO CARDÍACO



FONTE: Adaptado de Behar *et al.*, (2016)

Nota: PBL= fosfolambano, SERCA = sarcoplasmatic reticulum Ca²⁺ ATPase.

Inicialmente, as medidas de variabilidade de frequência cardíaca eram realizadas apenas através dos cálculos de variação da duração dos intervalos RR, ou seja, apenas as análises no domínio do tempo. Entretanto as análises no domínio do tempo se mostram limitadas para analisar a atuação do sistema nervoso autônomo no coração e o balanço simpato vagal, desta forma as análises no domínio da frequência mostraram maior utilidade (MALLIANI, LOMBARDI & PAGNI 1994).

Em modelo animal as medidas de variabilidade de frequência cardíaca no domínio da frequência também são validadas e utilizadas como ferramenta de investigação do sistema nervoso autônomo (KUWAHARA *et al.*, 1994; AUBERT *et*

al., 1999).

A VLF não tem explicação fisiológica bem definida, entretanto a mesma pode estar relacionada com o sistema renina - angiotensina - aldosterona, em alguma extensão ao sistema nervoso parassimpático, atividade vasomotora e termorregulação. (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996).

Apesar da pouca explicação fisiológica o índice VLF demonstrou ser um excelente marcador prognóstico para diversas patologias cardíacas como, por exemplo, a insuficiência cardíaca congestiva (HADASE et al., 2004).

Usui & Nishida, (2017) associam essa inexplicável relação entre VLF e doenças cardiovasculares com o fato do VLF representar um componente de recuperação lenta após atividade mental estressante. Neste estudo os participantes foram submetidos ao teste de Stroop durante 20 minutos. Neste teste são apresentadas palavras com nomes de cores (vermelho, verde, azul, por exemplo), entretanto cada palavra é colorida com uma cor diferente daquela que a palavra representa (a palavra vermelha é colorida de verde, a azul é colorida de amarelo, por exemplo) e o participante deve falar a cor que esta colorindo a palavra. Os autores observaram que os índices HF e VLF diminuíam durante o teste, entretanto o HF retornava a valores basais logo após o término do teste enquanto o VLF permanecia alterado até 120 minutos após o término do teste.

Os autores do estudo supracitado justificam os resultados encontrados com o fato de qualquer atividade mental estressora causar aumento do sistema renina angiotensina, aumento de inflamação, maior atividade do sistema simpático e diminuição do sistema parassimpático. Os marcadores inflamatórios após atividade mental estressora permanecem, assim como o VLF, alterados durante horas.

O índice VLF foi estudado por Taylor et al., (1998). Esses autores administraram, tanto na posição supina quanto durante o tilt-test, atropina, atenolol e Enalaprilat, fármaco que atua inibindo a enzima conversora da angiotensina, alterando, desta forma, o sistema renina-angiotensina. Foram observados, aumentos do VLF após administração de enalaprilat, diminuição após administração de atropina e aumentos durante a administração de propranolol. As alterações causadas pelo propranolol foram observadas apenas durante o supino e, segundo os autores, se deve ao aumento desordenadamente grande de apenas um dos

participantes da pesquisa. Assim os autores concluíram que o VLF é influenciado pelo sistema renina-angiotensina, assim como pelo ramo parassimpático do SNA.

O índice LF tem sido debatido em vários estudos e vários autores discordam com relação a sua explicação fisiológica. O mesmo pode ser considerado como um índice que reflete a atividade simpática (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996) independentemente do mecanismo pelo qual o sistema nervoso simpático esteja atuando (MALLIANI et al., 1991). Pode ser considerado como um índice que representa de forma conjunta o sistema simpático e parassimpático (HOULE; BILLMAN, 1999), ou como uma medida de avaliar a modulação da variabilidade da frequência cardíaca através do barorreflexo (GOLDSTEIN et al., 2012).

O HF parece ter explicação mais bem definida e reflete a atividade dos eferentes parassimpáticos, reflete a atividade vagal ativada pela respiração a arritmia sinusal respiratória (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996; BILLMAN, 2011; LOMBARDI; STEIN, 2011; HEATHERS)

Arritmia sinusal respiratória é o nome dado às flutuações rítmicas que ocorrem na frequência cardíaca devido à frequência respiratória. É caracterizado pela diminuição e aumento do período entre dois batimentos cardíacos que ocorrem concomitantemente com a inspiração e expiração, respectivamente. Ou seja, a frequência cardíaca tende a aumentar durante a inspiração e diminuir durante a expiração (BERNTSON; CACIOPPO; QUIGLEY, 1993).

A respiração modula a atividade vagal por dois mecanismos: projeção vindas diretamente do centro gerador respiratório ao núcleo ambíguo, e de aferentes pulmonares ativadas durante o enchimento pulmonar (estiramento), esses ativam neurônios GABAérgicos no núcleo do trato solitário que inibem neurônios vagais no núcleo ambíguo (CARBEVALI & SGOIFO, 2014)

Uma vez que o LF pode ser considerado um marcador da atividade simpático e o HF um marcador da atividade parassimpática, a razão LF/HF é considerada por alguns autores como um marcador capaz de refletir o balanço simpatovagal (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996;

VANDERLEI et al, 2009) como mostra o estudo de Pagani *et al.*, (1986) que avaliou a variabilidade da frequência cardíaca durante o tilt-test e mostrou que há aumento do LF/HF e esse aumento pode ser abolido através da administração de propranolol. Montano et al., (1994) mostrou que o índice LF/HF, assim como o uso do LF e HF em unidades normalizadas, foi capaz de prover informações a respeito do balanço simpato vagal durante teste gradual de tilt.

Entretanto, o fato do índice LF/HF refletir o balanço simpatovagal já foi contestado por alguns autores (BILLMAN, 2013; HEATHERS, 2012).

O uso de unidades normalizadas é uma estratégia matemática a fim de isolar os componentes do sistema nervoso autônomo, onde o LFnu seria predominantemente simpático e o HFnu predominantemente parassimpático. O LFnu é calculado de acordo com a seguinte fórmula $LFnu = LF / (LF + HF)$ e o HFnu $HFnu = HF / (LF + HF)$. Os índices LFnu com relação ao HFnu ou ambos os índices com relação ao LF/HF apresentam redundância, uma vez que, o aumento em uma das variáveis, LFnu por exemplo, causa diminuição de mesma magnitude na outra, HFnu nesse caso, podendo uma unidade normalizada ser calculada a partir da outra da seguinte forma ($HFnu = 1 - LFnu$). A razão LF/HF irá se comportar da mesma forma que os índices LFnu e HFnu, onde aumentos no LFnu irão aumentar a razão LF/HF e aumentos no HFnu irão diminuir a razão LF/HF, (BLUR, 2007).

Segundo Moraes *et al.*, (2000) a VFC tem sido utilizada de forma satisfatória para demonstrar a atividade parassimpática, porém tem falhado em demonstrar diretamente a atividade simpática. A esse respeito Kleiger *et al.*, (2005) diz que as manipulações dos índices da análise espectral como LFnu, HFnu e razão LF/HF são baseadas em conceitos simplificados da atuação do sistema nervoso autônomo, o que pode levar a interpretações errôneas em diversas situações.

Não apenas os índices da análise espectral podem refletir diretamente o sistema nervoso autônomo. O índice RMSSD possui correlação forte com o índice HF (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996), assim como o SD1 (HOSHI *et al.*, 2013).

2.3 CORAÇÃO ISOLADO

As origens dos estudos com coração isolado datam do século XIX com os experimentos de Carl Ludwig, sendo que o primeiro pesquisador a descrever o método foi Elias Cyon em 1866 onde o coração de rã era canulado através da veia cava. Os estudos com coração de sapo serviram de base para a preparação da perfusão retrógrada de Langendorff utilizada para estudar o coração isolado de mamíferos. No método de Langendorff o coração é perfundido retrogradamente, ou seja, pela artéria aorta. Uma vez que a valva aórtica se encontra fechada, a solução que perfunde o coração segue pelas artérias coronarianas, passa pelo leito vascular até ser drenado para o seio coronariano localizado no átrio direito. Existem dois modelos de perfusão possíveis, o modelo de pressão constante e o modelo de fluxo constante. No modelo de pressão constante o reservatório com tampão de perfusão deve ficar a uma distância/altura conhecida. A coluna de fluido mantém a pressão hidrostática constante. No modelo de fluxo constante o fluxo é mantido através de uma bomba peristáltica (BELL et al, 2011; SKRZYPIEC-SPRING et al., 2006).

O baixo custo, a simplicidade da preparação, a reprodutibilidade e a capacidade de estudar o órgão isolado de outros sistemas fazem com que a perfusão retrógrada de Langendorff, mesmo descrita pela primeira vez em 1895, continue sendo um método relevante nos dias de hoje (BELL et al., 2011; SKRZYPIEC-SPRING et al., 2006; SUTHERLAND; HEARSE, 2000).

Este método tem se mostrado valioso para o entendimento de diversos tópicos da fisiologia cardiovascular como: fluxo coronariano, contratilidade, eletrofisiologia de células cardíacas e estudos farmacológicos de dose-resposta (BELL et al, 2011; SKRZYPIEC-SPRING et al., 2006; SUTHERLAND; HEARSE, 2000). O coração isolado é também um recurso para ajudar a elucidar os mecanismos a respeito da origem da variabilidade da frequência cardíaca (JANOUSEK et. al., 2010).

Ainda que a variabilidade da frequência cardíaca reflita o controle do sistema nervoso autônomo, o coração, quando estudado através da técnica do coração isolado, pode responder a mudanças ambientais mesmo não estando sob controle neuro humoral (MUKINA; DVORNIKOV; KAMAIDANOV, 2000). Logo a variabilidade da frequência cardíaca está presente, ainda que reduzida, no coração isolado, estudado em modelos animais, e no coração do paciente transplantado, a despeito da desnervação (FREY et al., 1996).

Frey et al., (1996) analisaram a variabilidade da frequência cardíaca do

coração isolado de sete coelhos e relataram a presença de variabilidade no coração isolado mostrando que a variabilidade está presente no coração isolado mesmo sem enchimento atrial e ventricular indicando que o alongamento dessas estruturas não influencia na taxa de disparos do nodo sino atrial.

Mukina et al., (2000) investigaram a frequência cardíaca e a variabilidade da frequência cardíaca de ratos machos. Os autores encontraram redução da frequência cardíaca de 40% e aumento da variabilidade da frequência cardíaca calculada através do desvio padrão dos intervalos R-R. Entretanto, o aumento da variabilidade da frequência cardíaca pode ser decorrente da diminuição da frequência cardíaca. Segundo Tsuji et al., (1996) a frequência cardíaca é um dos principais determinantes da VFC, desta forma são esperados maiores valores de VFC em indivíduos com menor frequência cardíaca. Os estudos supracitados corroboram com os estudos de Sacha (2014), Sacha e Pluta (2008) e Sacha e Pluta (2005) que demonstram que maiores valores de intervalos RR permitem maior variabilidade entre intervalos.

Janousek et al., (2010) compararam a variabilidade da frequência cardíaca de sete corações isolados com a variabilidade da frequência cardíaca de cinco coelhos *in vivo*. Após a aquisição dos intervalos R-R, trinta e cinco parâmetros de variabilidade de frequência cardíaca foram calculados. Os valores das bandas VLF, LF e HF da análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca sem mostram duas vezes maiores *in vivo* do que no coração isolado. Os demais índices no domínio do tempo também se mostraram diminuídos no coração isolado.

Apesar de experimentos prévios observarem a existência de variabilidade da frequência cardíaca no coração isolado os mecanismos responsáveis ainda não foram totalmente elucidados (FREY et al., 1996; JANOUSEK et al., 2010).

O coração pode responder a mudanças ambientais independentemente do sistema nervoso autônomo (MUKINA et al., 2000). Foi reportada arritmia sinusal respiratória normal em pacientes transplantados, os autores do estudo concluíram que as flutuações da banda de frequência da análise espectral relacionada a frequência respiratória estão relacionadas as mudanças dependentes da pressão intracardíaca (HRUSHESKY et al., 1984 apud FREY et al., 1996). Mukina et al., (2000) associa essas mudanças intrínsecas do coração ao do balanço iônico nas células marca passo do nodo sinoatrial.

A função marca passo nas células do nodo sinoatrial decorre da capacidade

dessas células gerarem uma despolarização diastólica através de uma corrente ativada por hiperpolarização (I_f), cujo limiar de ativação é de aproximadamente -40/-50 mV (ACCILI et al, 2002). Após o termino do potencial de ação, ocorre uma despolarização lenta da membrana até atingir o limiar para um novo potencial de ação. Essa despolarização diastólica é responsável pelo comportamento rítmico e caracteriza os potenciais de ação do nodo sinoatrial (DIFRANCESCO, 1993).

A corrente I_f ocorre através dos canais HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels), que apresentam topologia típica de um canal de K^+ voltagem dependente, com seis segmentos transmembrana, segmento S4 carregado positivamente. Esse canal também apresenta um sítio de ligação para o AMPc na sua região carboxiterminal (ACCILI et al., 2002; XU et al., 2010). A família de canais HCN contém quatro membros (HCN1-4) sendo o HCN4 o mais expresso nas células do nodo sinoatrial (XU et al., 2010; WAHL-SCHOTT e BIEL, 2008).

O canal HCN, além da sua função na geração da corrente marca passo, desempenha um papel na regulação da frequência cardíaca em resposta estimulação do sistema nervoso autônomo. A estimulação adrenérgica aumenta a produção de AMPc aumentando, consequentemente, a frequência cardíaca enquanto a estimulação vagal diminui a frequência cardíaca através da inibição da síntese de AMPc (ACCILI et al., 2002; WAHL-SCHOTT e BIEL, 2008).

Papaioannou et al., (2013) em revisão de literatura a respeito da origem da VFC mostra que a mesma pode ser alterada após administração de bloqueadores da corrente I_f por meio de diversos mecanismos, seja pela modulação da frequência cardíaca ou por atuar na sensibilidade do sistema barorreflexo.

3 MÉTODOS

O estudo foi composto por duas fases. Durante a fase 1 foi realizado um estudo prospectivo para analisar a VFC de ratos após manipulação farmacológica. Na fase 2 foi realizado um estudo retrospectivo, por meio de um banco de dados. Ambos os estudos foram realizados nas dependências do Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascular, localizado no Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da UFPR.

3.1 ESTUDO PROSPECTIVO (FASE 1)

A fase 2 do estudo teve como objetivo a análise do comportamento da VFC após a administração de atropina, propranolol, atropina e propranolol combinados, isoproterenol e ivabradina. O seguinte cronograma (QUADRO 2) foi utilizado para a coleta de dados.

QUADRO 2 - LINHA CRONOLÓGICA DO ESTUDO

Primeira Semana	Terceira Semana		Quarta Semana		Quinta Semana	
segunda feira	segunda feira	quinta feira	segunda feira	quinta feira	segunda feira	quinta feira
implante dos eletrodos	ECG basal	ECG basal	ECG basal	ECG basal	ECG basal	ECG basal
	administração de salina	administração de atropina	administração de propranolol	administração de atropina e propranolol	administração de isoproterenol	administração de ivabradina
	ECG após salina	ECG após atropina	ECG após propranolol	ECG após fármacos	ECG após isoproterenol	ECG após ivabradina

FONTE: O autor (2018)

3.1.1 Preparação animal e implantação dos eletrodos

A amostra foi composta por 20 ratos Wistar, com peso aproximado de 250-300g, com idade de 90 dias. O cálculo amostral baseou-se nos seguintes critérios estatísticos: $r = 2t\alpha \frac{s^2}{d^2}$

Onde r é o tamanho da amostra, s^2 é uma estimativa da variância experimental oriunda de experimento já realizado; $t\alpha$ = valor de t com os graus de liberdade de s^2 e para um nível α de probabilidade; d = diferença desejada entre os

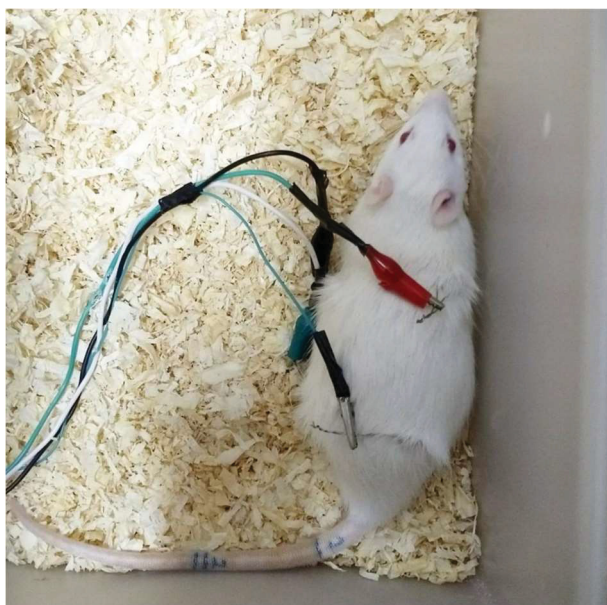
tratamentos. O nível de significância de 5% foi considerado e o poder do teste de 80%. Os cálculos foram baseados nos resultados do estudo de Barbier et al (2006) sendo para o presente estudo um tamanho de amostra mínima calculado em 17 animais, considerando perdas de dados consequentes do modelo de perfusão retrograda de Langendorff (coração isolado) foi estipulado 20 animais.

Antes do implante dos eletrodos os animais foram mantidos por uma semana em instalações apropriadas dentro do laboratório onde os procedimentos de coleta de dados foram realizados, com temperatura controlada entre 18-21°C, livre acesso a ração e água, ciclo claro e escuro de 12 horas. Estes procedimentos foram realizados para aclimatar os animais ao ambiente de coleta de dados.

No primeiro dia de experimento os animais foram anestesiados com 50mg/Kg cetamina e 10mg/Kg xilazina (com aumento de 10% da dose durante o procedimento baseado na resposta reflexa ao pinçamento das patas traseiras) e os eletrodos foram implantados. Foram utilizados eletrodos subcutâneos tipo piercing (aço inoxidável de 0,5mm na região posterior e abaixo a linha de inserção das patas dos animais), de maneira que as derivações DI e DII de um ECG convencional pudessem ser avaliadas (FIGURA 6).

As doses anestésicas e a metodologia para a implantação dos eletrodos já foram estudadas previamente em pesquisa aprovada pelo CEUA-BIO sob o número de protocolo 816.

FIGURA 6 - ELETRODOS SUBCUTÂNEOS PARA ECG EM RATOS



FONTE: O autor (2018)

3.1.2 Administração dos fármacos

Após um tempo mínimo de 72h da implantação dos eletrodos os animais foram submetidos a testes de ECG por uma semana, três vezes na semana, a fim de acostumar os animais aos procedimentos, a duração do ECG foi de 30 minutos. Após esse período foi administrada solução salina via intraperitoneal (em volume 2ml/kg de peso corporal (NaCl 0,9 %). A VFC após a administração de solução salina foi comparada com a VFC antes administração de salina a fim de garantir que mudanças da VFC após o uso dos fármacos não seriam causadas pela manipulação dos animais, mas sim pelos fármacos propriamente ditos.

Nas demais semanas de experimento, foram aplicados os demais fármacos, todos via intraperitoneal, respeitando um intervalo mínimo de 72 horas entre cada aplicação, período maior que a meia vida de cada fármaco. Os fármacos utilizados foram os seguintes: atropina (A; 2 mg/kg), propranolol (P; 4 mg/kg), propranolol mais atropina (PA; A; 2 mg/kg + P; 4 mg/kg) isoproterenol (I; 1 mg/kg) e ivabradina (2 mg/kg). Todos os fármacos foram diluídos para que todas as aplicações tivessem um volume fixo de 250 µL. As dosagens de atropina e propranolol assim como a dose desses dois fármacos combinados foram baseadas no estudo de Barbier et al (2006). A dose de isoproterenol utilizada foi calculada a partir dos estudos que utilizaram doses altas e tratamento contínuo para causar hipertrofia cardíaca, como o objetivo do presente estudo não era causar danos cardíacos doses menores foram utilizadas (KRENEK et al., 2009). Já as doses de ivabradina foram baseadas nos estudos de (DIAS DA SILVA et al., 2015 e DA SILVA et al., 2016)

A atropina é um antagonista colinérgico ou antimuscarínico cujo principal efeito no sistema cardiovascular é a taquicardia. A meia vida da atropina é de aproximadamente quatro horas. O propranolol é um antagonista beta-adrenérgico com meia vida de aproximadamente três horas e induz redução no débito cardíaco (SPINOSA et al., 2006).

O isoproterenol é um agonista simpático que atua nos receptores beta1 e beta2, causando aumento no inotropismo e cronotropismo assim como vasodilatação periférica. Primeiramente foi indicado para tratamento de insuficiência cardíaca, entretanto sem sucesso uma vez que efeitos adversos como taquicardia

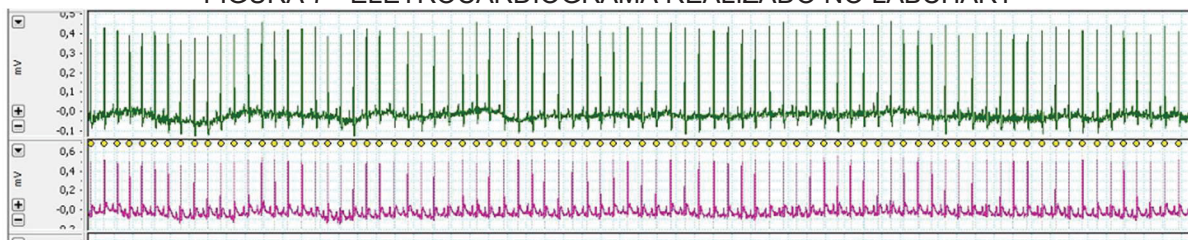
são encontrados após o uso do isoproterenol (KOPEL; CARVALHO; LAGE, 2004). Possui meia vida curta, de aproximadamente dois minutos (OSTINI et al., 1998).

A ivabradina é um bloqueador seletivo dos canais ativados por hiperpolarização regulados por nucleotídeo cíclico, ou seja, bloqueia a corrente marcapasso das células do nodo sinusal e seu efeito principal é a bradicardia (SILVA et al., 2016). A ivabradina tem meia vida plasmática de duas horas enquanto seus efeitos duram até onze horas (DEEDWANIA, 2013).

3.1.3 Eletrocardiograma e variabilidade da frequência cardíaca

O registro eletrocardiográfico foi obtido empregando a unidade Power Lab 26T conectado a um computador no módulo de ECG. Para análise dos sinais de ECG foi utilizado o software LabChart 7.0. (FIGURA 7). Além dos intervalos RR que foram utilizados para o cálculo da variabilidade da frequência cardíaca os ECGs foram analisados quanto a morfologia das ondas, amplitude das ondas e com relação ao ritmo. Quando qualquer alteração de ritmo como ausência de onda P, extra-sístole ventricular, fibrilação atrial ou morfologia anormal eram encontradas o ECG era excluído da análise. No presente estudo apenas um ECG, após administração de ivabradina, precisou ser excluído. Após a aquisição dos dados o software LabChart (FIGURA 8) permite a identificação de ondas R ectópicas, que pode ocorrer devido a movimentação do animal, e a posterior limpeza dos dados, de forma que apenas os intervalos RR considerados normais serão analisados.

FIGURA 7 - ELETROCARDIOGRAMA REALIZADO NO LABCHART



FONTE: O autor (2018)

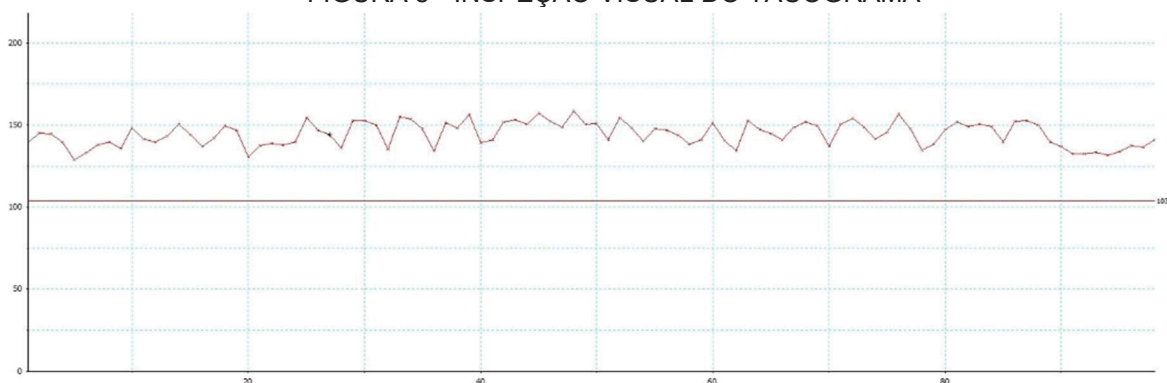
NOTA: O software labchart permite a seleção do trecho de interesse do eletrocardiograma e reconhecimento das ondas RR para posterior inspeção visual e exclusão de batimentos ectópicos e artefatos.

O eletrocardiograma foi realizado antes e após a administração dos fármacos a fim de analisar os efeitos dos mesmos na duração dos intervalos R-R normais e

posteriormente, seus efeitos na variabilidade da frequência cardíaca. O eletrocardiograma realizado antes da administração dos fármacos teve duração de 30 minutos e após a aplicação dos fármacos o ECG teve duração de 50 minutos.

Após a aquisição e tratamentos dos intervalos RR, com uso do software LabChart, um trecho do eletrocardiograma foi selecionado e os intervalos RR desse trecho foi exportado ao software Kubius HRV (versão 2.0 MATLAB, MathWorks Inc., Kuopio, Finland). O software Kubios é específico para análise de VFC e permite a análise no domínio do tempo, no domínio da frequência assim como análises não lineares da VFC. A linha cronológica dos procedimentos de coleta de ECG e cálculo da VFC estão resumidos no quadro 3.

FIGURA 8 - INSPEÇÃO VISUAL DO TACOGRAMA

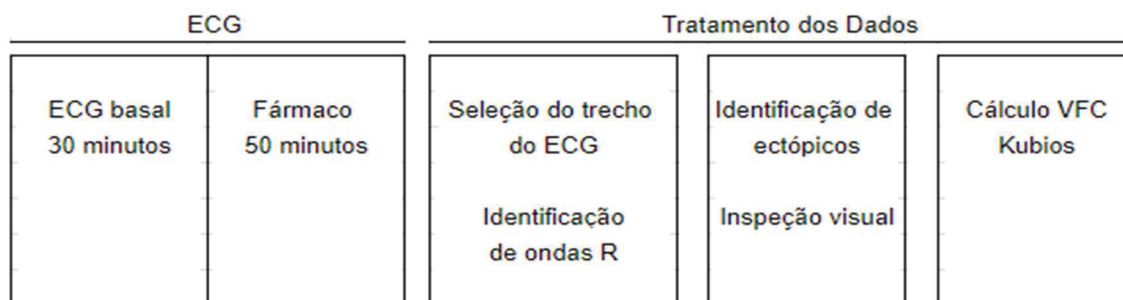


FONTE: O autor (2018)

Foram calculados os valores: Total power, HF, LF, VLF, (que correspondem aos valores numéricos das bandas de frequência da análise espectral), HFnu e LFnu que representam os valores da análise espectral em unidades normalizadas calculados através da exclusão do VLF. O LFnu é calculado de acordo com a seguinte fórmula $LFnu = LF / (LF + HF)$ e o HFnu $HFnu = HF / (LF + HF)$ (BURR, 2007). No domínio do tempo os seguintes valores foram calculados: SDNN (desvio padrão dos intervalos RR), RMSSD (raiz quadrada das médias do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes), Mean HR (frequência cardíaca média) e os seguintes valores correspondentes a análise não linear da variabilidade da frequência cardíaca: SD1, SD2 e SD2/SD1 (índices numéricos calculados no Plot de Poincaré), SamEn (Sample entropy – Entropia da amostra), DFA α 1 e DFA α 2 (detrended fluctuation analysis). Ainda a respeito da análise espectral a mesma foi analisada com relação a porcentagem de cada banda de frequência com relação ao

total power (VLF+LF+HF), sendo assim $\%VLF = (VLF/TotalPower) \times 100$, $\%LF = (LF/TotalPower) \times 100$ e $\%HF = (HF/TotalPower) \times 100$.

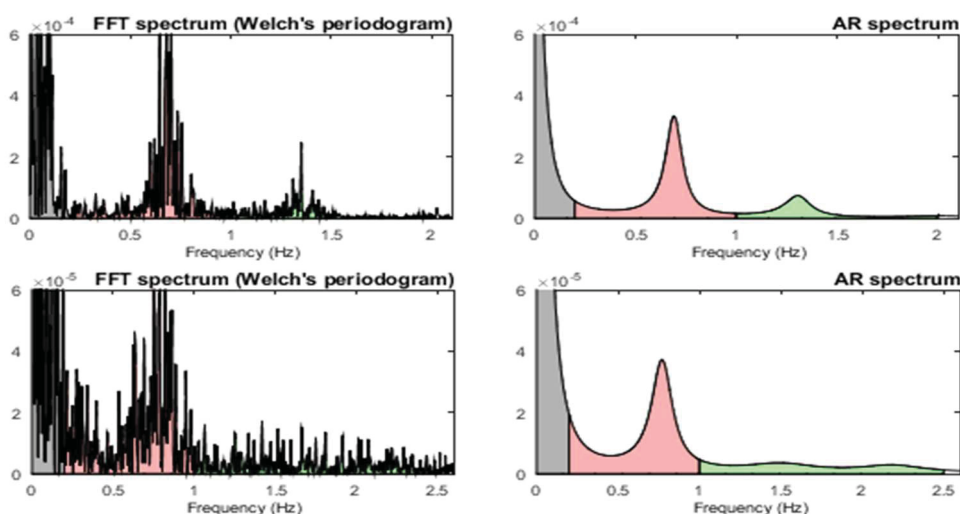
QUADRO 3 - LINHA CRONOLÓGICA DO PROCEDIMENTO DE COLETA DO ECG E POSTERIOR ANÁLISE DOS INTERVALOS RR E CÁLCULO DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA



FONTE: O autor (2018)

No presente estudo, as bandas da análise espectral utilizadas foram as seguintes: Banda de muito baixa frequência, VLF - 0 a 0,2 Hz (very low frequency); banda de baixa frequência, LF - 0,2 a 1 Hz (low frequency) e, banda de alta frequência HF - 1 a 3 Hz (high frequency). Os valores utilizados foram baseados no estudo de Mangin (1998). O software Kubios permite a inspeção visual das bandas da análise espectral, logo, no presente estudo foi realizada a inspeção visual das bandas de frequência da análise espectral para posterior determinação dos valores das bandas de frequência (FIGURA 9).

FIGURA 9 - ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA



FONTE: O autor (2018)

Nota: Valores da banda LF menores que 1 Hz não se ajustariam à banda correspondente, reduzindo-a à metade, não se aplicados aos dados do presente estudo

3.2 ESTUDO RETROSPECTIVO (FASE 2)

O estudo retrospectivo foi realizado utilizando um banco de dados composto por eletrocardiogramas realizados em uma pesquisa anterior aprovada pelo CEUA-BIO, sob o número 866, intitulada: Efeito do treinamento intervalado sobre a variabilidade da frequência cardíaca e remodelamento cardíaco em ratos diabéticos. Este estudo quantificou, em coração isolado, valores de pressão intraventricular com e sem o uso do isoproterenol. A variabilidade da frequência cardíaca do coração isolado foi então avaliada no presente estudo.

Deste estudo foram quantificados os dados de VFC de 20 ratos Wistar, não diabéticos, sem sedação e sem restrição e a VFC do coração isolado dos mesmos animais. Os dados com coração isolado incluem a análise de VFC antes e após a administração do agonista simpático isoproterenol, realizada em 16 corações isolados.

Todos os equipamentos utilizados para a obtenção dos dados do estudo retrospectivo, coleta de ECG e VFC, foram idênticos aos utilizados no estudo prospectivo (detalhado acima).

3.2.1 Perfusão Retrograda de Langendorff (coração isolado)

Anestesiado (cloridrato de cetamina, 80 mg/Kg; e cloridrato de xilazina, 20 mg/Kg), o animal foi colocado em decúbito dorsal, com as patas presas, para que fosse realizada a exsanguinação, toracotomia e a remoção do coração. Após a dissecação os corações foram perfundidos retrogradamente através de uma cânula, fixada na artéria aorta, com solução de Krebs-Henseleit continuamente oxigenada e mantida a uma temperatura constante de 37°C, pressão de perfusão constante (60 mm/Hg), mantendo o coração imerso na solução supracitada, de idêntica composição (BELL et al., 2011; SKRZYPIEC-SPRING et al., 2007; DIAS et al. 2006). A composição da solução krebs-henseleit utilizada foi a seguinte: 118 mM de NaCl, 4.7 mM de KCL, 1.2 mM de KH_2PO_4 , 1.2 mM de MgSO_4 , 25 mM de NaHSO_4 , 11 mM de Glicose, 1.5 mM de CaCl_2 , essa solução é oxigenada com gás carbogênico contendo 95 % de oxigênio e 5 % de gás carbônico.

Uma vez que o coração isolado, após perfundido, é submerso em uma câmara preenchida com solução de Krebs-Henseleit, o posicionamento de eletrodos

nessa câmara, em contato com a solução, permite a obtenção do registro eletrocardiográfico. O registro eletrocardiográfico foi obtido empregando a unidade Power Lab 26T conectado a um computador no módulo de ECG e com o uso do software LabChart. Foram mensurados os valores de pressão intracavitária de ventrículo esquerdo, frequência cardíaca, índices de contratilidade assim como as derivações 1 e 2 do eletrocardiograma.

Um balão complacente, mas não elástico, feito de plástico, preenchido com água e conectado a um transdutor de pressão foi inserido no ventrículo esquerdo através de uma incisura no átrio esquerdo. O balão deve ter volume aproximado de 0,4 ml e permitir que o ventrículo esquerdo seja completamente preenchido pelo balão, entretanto sem modificar sua forma (CURTIS, et. al. 1986). O balão é inserido vazio até o ventrículo esquerdo e seu volume de água é preenchido paulatinamente, a cada novo volume inserido é observado um aumento na pressão gerada pelo coração (Lei de Frank-Starling). O volume do balão é aumentado até o ponto onde aumentos no volume não ocasionam aumentos na pressão. Ao chegar nesse ponto o ECG teve duração de 30 minutos. Após esse período, a perfusão foi realizada com solução de Krebs-Henseleit com adição de isoproterenol na concentração de 100 nM.

Após a coleta de dados, um trecho do eletrocardiograma foi selecionado e os intervalos RR desse trecho foram exportados ao software Kubius HRV. Os mesmos índices calculados *in vivo* foram calculados no coração isolado. A seleção dos intervalos RR e posterior análise no software Kubius esta descrita nos procedimentos do estudo prospectivo (fase 1)

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente foi realizado o teste de Shapiro-Wilk a fim de testar a normalidade da distribuição dos dados. Posteriormente ao teste de normalidade um teste de hipótese foi aplicado. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram descritas na tabela no formato média e desvio padrão (média \pm sd) enquanto as variáveis que não apresentaram distribuição normal foram descritas no formato mediana e amplitude interquartis (mediana - IQR).

Todas as variáveis analisadas no presente estudo foram comparadas antes da administração dos fármacos e após a administração dos fármacos (controle x

fármaco) ou então no formato *in vivo* e coração isolado (*in vivo* x coração isolado) de forma que cada animal foi controle dele mesmo. Para esse modelo de análise é necessário um teste estatístico para amostras dependentes. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal o teste-T para amostras dependentes foi utilizado e para as variáveis que não apresentaram distribuição normal o teste de Wilcoxon foi utilizado. O nível de significância foi mantido em 5 %.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o software estatístico SPSS.

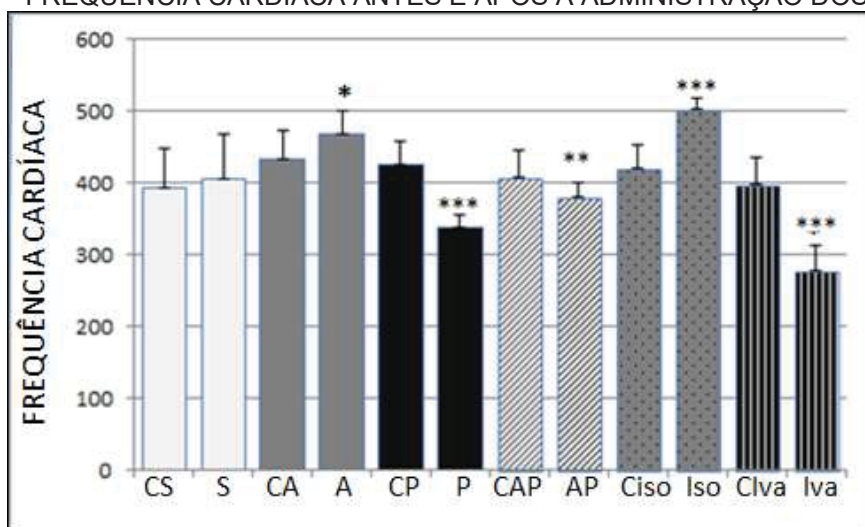
4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DO ESTUDO PROSPECTIVO

Para todos os fármacos o número de animais utilizados foi de 20 (n=20), entretanto para a análise após a aplicação da ivabradina apenas 18 animais foram utilizados, uma vez, que um animal morreu durante o período de tempo utilizado para a realização dos experimentos e um dos eletrocardiogramas apresentou alterações de ritmo que impossibilitaram sua análise. Os dados numéricos não apresentados ao longo da seção estão detalhados nos apêndices 1 e 2.

Com relação à frequência cardíaca, todos os fármacos utilizados causaram alterações significativas (GRÁFICO 1), tendo a frequência cardíaca diminuído após a administração de propranolol e ivabradina e aumentado após a administração de atropina e isoproterenol. A administração combinada de atropina e propranolol reduziu a frequência cardíaca.

GRÁFICO 1 - FREQUÊNCIA CARDÍACA ANTES E APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS



FONTE: O autor (2018)

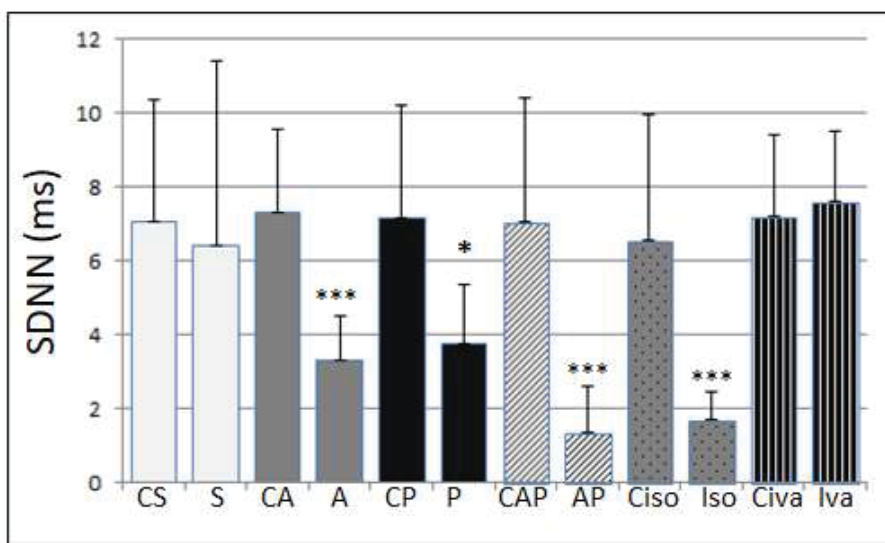
NOTA: Controle salina (CS), salina (S), controle atropina (CA) atropina (A), controle propranolol (CP), propranolol (P), controle atropina e propranolol (CAP), controle isoproterenol (C Iso), isoproterenol (iso), controle ivabradina (C Iva), ivabradina (Iva). * Representa valor de $p < 0,05$; ** Representa valor de p igual 0,01; *** Representa valor de p menor que 0,001.

Em relação à análise da VFC no domínio do tempo, o índice SDNN (GRÁFICO 2) diminuiu após a administração de atropina, propranolol e isoproterenol e não foi afetado após administração de ivabradina. As reduções, em média, foram de: 57,2% para a atropina, 47% para o propranolol, 73,7% para isoproterenol e 80%

para atropina e propranolol.

O índice RMSSD (GRÁFICO 3) também diminui após administração de atropina (redução de 78%), propranolol (17%), atropina e propranolol combinados (76,7%), isoproterenol (72%) e aumentou após administração de ivabradina (39,3%). A administração de salina não alterou nenhuma variável da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo.

GRÁFICO 2 - SDNN APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS

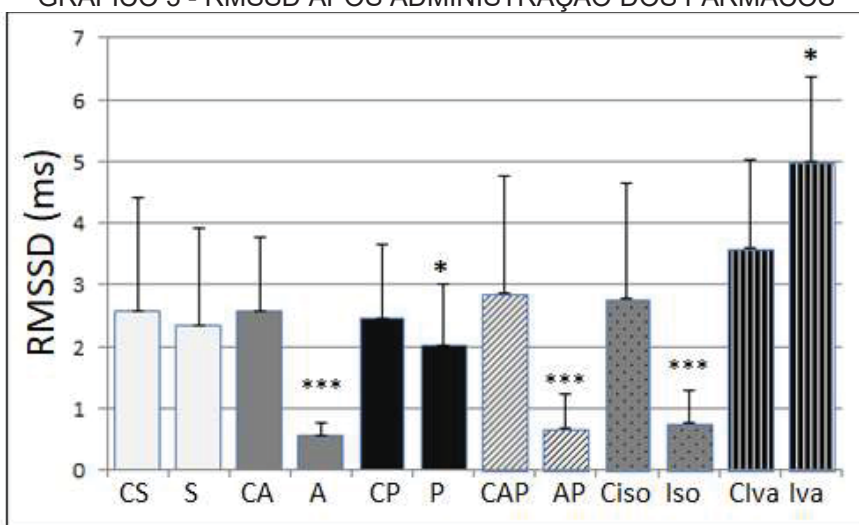


FONTE: O autor (2018)

NOTA: Controle salina (CS), salina (S), controle atropina (CA) atropina (A), controle propranolol (CP), propranolol (P), controle atropina e propranolol (CAP), controle isoproterenol (C Iso), isoproterenol (iso), controle ivabradina (C Iva), ivabradina (Iva). * Representa valor de $p < 0,05$; *** Representa valor de p menor que 0,001.

No domínio da frequência, com exceção da salina e da ivabradina, todos os fármacos causaram reduções dos índices de VFC. Todos os índices, em valores absolutos, foram reduzidos.

GRÁFICO 3 - RMSSD APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS

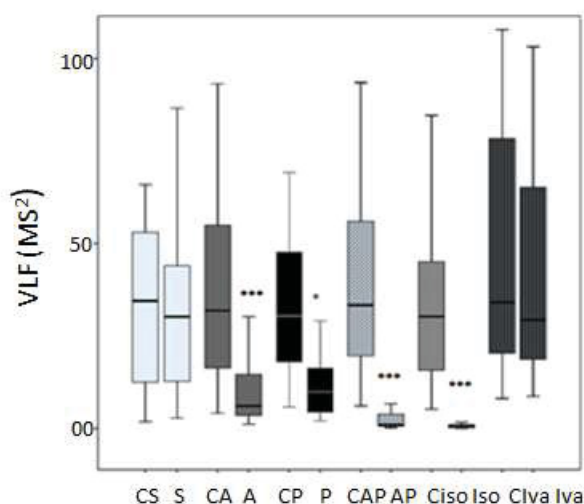


FONTE: O autor (2018)

NOTA: Controle salina (CS), salina (S), controle atropina (CA) atropina (A), controle propranolol (CP), propranolol (P), controle atropina e propranolol (C AP), controle isoproterenol (C Iso), isoproterenol (iso), controle ivabradina (C Iva), ivabradina (Iva). * Representa valor de $p < 0,05$; *** Representa valor de p menor que 0,001.

As reduções para o VLF (GRÁFICO 4), LF (GRÁFICO 5) e HF (GRÁFICO 6) foram de 80%, 94% e 93,7% para a atropina, 67%, 65% e 41,9% para o propranolol, 96,8%, 96% e 96,6% para atropina e propranolol combinados e 97%, 92% e 92% para o isoproterenol.

GRÁFICO 4 - ALTERAÇÕES NO VLF APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS



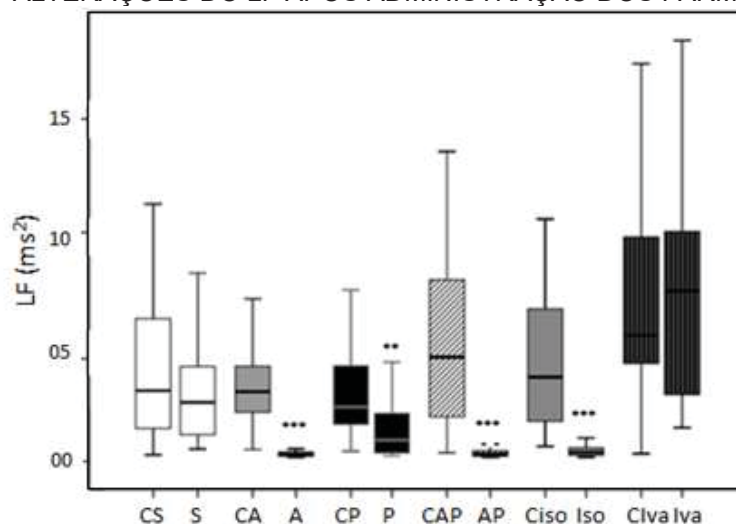
FONTE: O autor (2018)

NOTA: Controle salina (CS), salina (S), controle atropina (CA) atropina (A), controle propranolol (CP), propranolol (P), controle atropina e propranolol (C AP), controle isoproterenol (C Iso), isoproterenol (iso), controle ivabradina (C Iva), ivabradina (Iva). * Representa valor de $p < 0,05$; *** Representa valor de p menor que 0,001.

Relativo a unidades normalizadas (GRÁFICO 8), não houve diferenças significativas após administração de atropina e atropina combinada com propranolol.

Enquanto houve aumento do HFnu e consequente diminuição do LFnu quando propranolol e isoproterenol foram administrados aos animais.

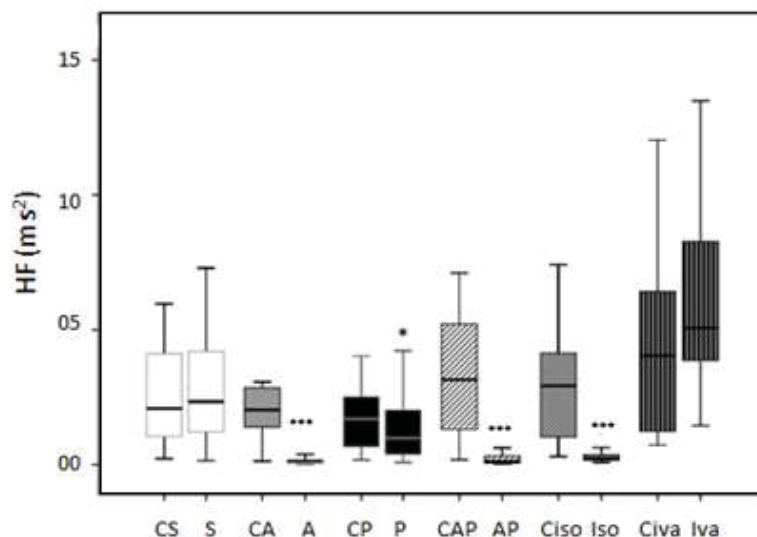
GRÁFICO 5 - ALTERAÇÕES DO LF APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS



FONTE: O autor (2018)

NOTA: Controle salina (CS), salina (S), controle atropina (CA) atropina (A), controle propranolol (CP), propranolol (P), controle atropina e propranolol (C AP), controle isoproterenol (C Iso), isoproterenol (iso), controle ivabradina (C Iva), ivabradina (Iva). ** Representa valor de p igual 0,01; *** Representa valor de p menor que 0,001.

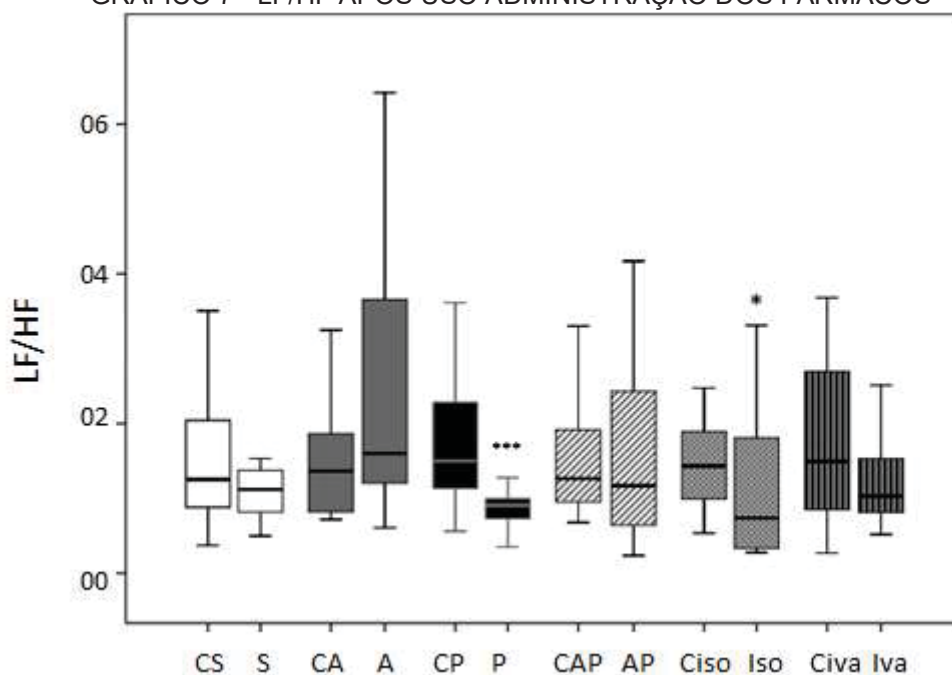
GRÁFICO 6 - HF APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS



FONTE: O autor (2018)

NOTA: Controle salina (CS), salina (S), controle atropina (CA) atropina (A), controle propranolol (CP), propranolol (P), controle atropina e propranolol (C AP), controle isoproterenol (C Iso), isoproterenol (iso), controle ivabradina (C Iva), ivabradina (Iva). * Representa valor de p < 0,05; *** Representa valor de p menor que 0,001

GRÁFICO 7 - LF/HF APÓS USO ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS

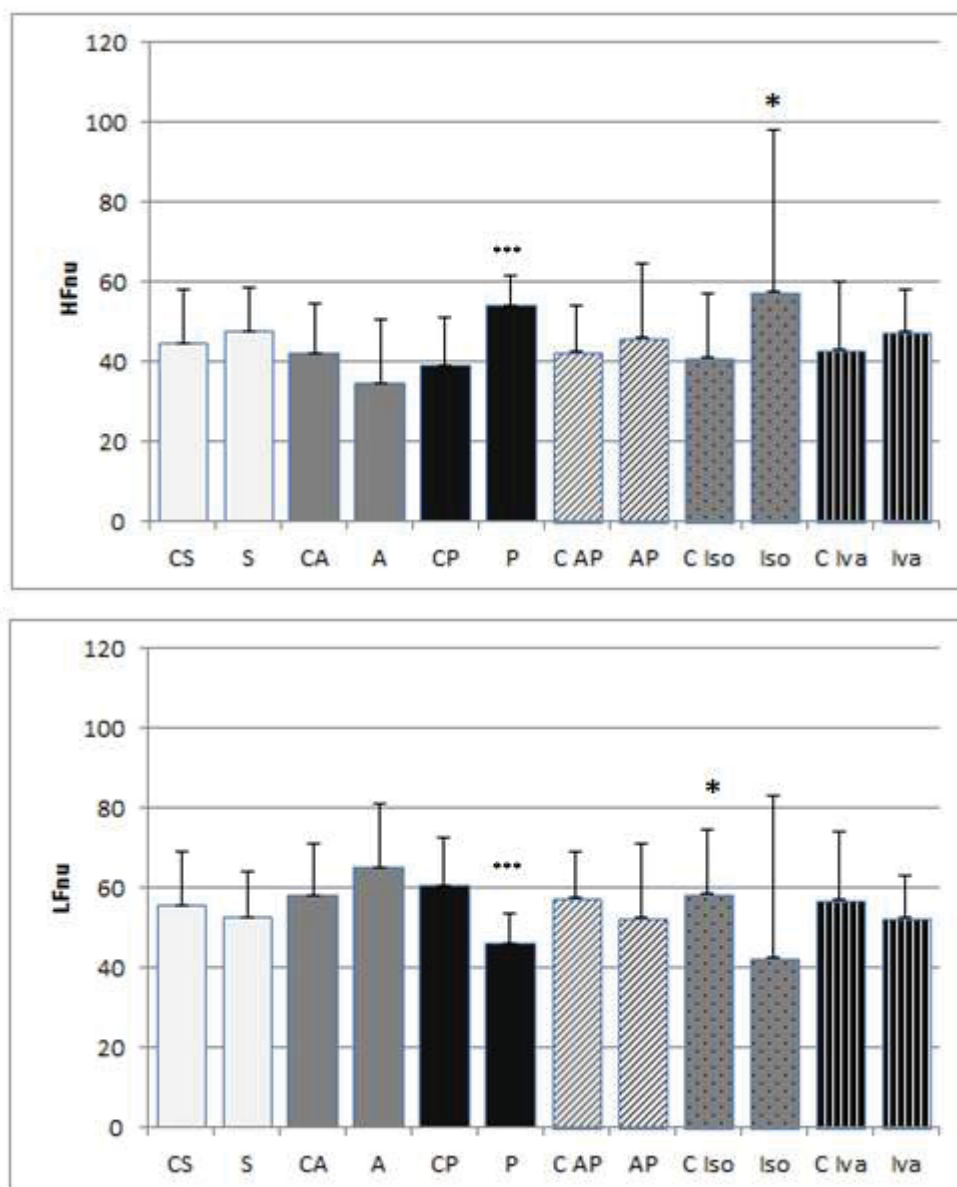


FONTE: O autor (2018)

Nota: Controle salina (CS), salina (S), controle atropina (CA) atropina (A), controle propranolol (CP), propranolol (P), controle atropina e propranolol (CAP), controle isoproterenol (C Iso), isoproterenol (iso), controle ivabradina (C Iva), ivabradina (Iva). * Representa valor de $p < 0,05$; *** Representa valor de p menor que 0,001

Comumente, as variáveis LFnu e HFnu são calculadas na ausência do VLF. Como o VLF foi alterado após administração de atropina, propranolol, isoproterenol e atropina e propranolol combinados, foi realizada uma segunda análise do LFnu e HFnu, entretanto, esses índices foram calculados sem a exclusão do VLF.

GRÁFICO 8 - LFNU E HFNU APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS

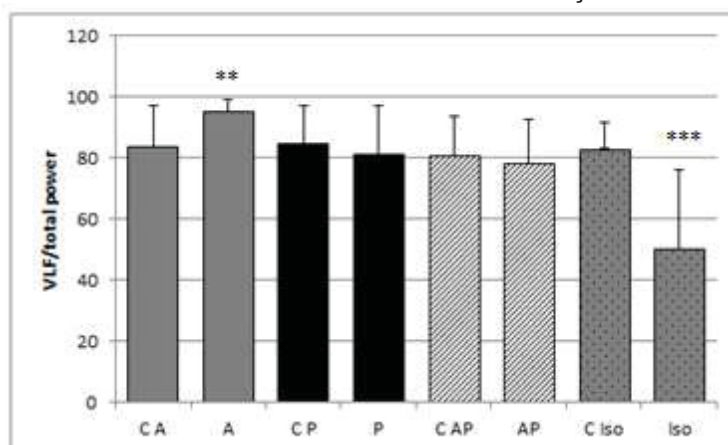


FONTE: O autor (2018)

NOTA: Controle salina (CS), salina (S), controle atropina (CA) atropina (A), controle propranolol (CP), propranolol (P), controle atropina e propranolol (C AP), controle isoproterenol (C Iso), isoproterenol (iso), controle ivabradina (C Iva), ivabradina (Iva). * Representa valor de $p < 0,05$; *** Representa valor de p menor que 0,001

Nesta segunda análise dos valores normalizados não foram encontradas diferenças após administração de propranolol ou de atropina e propranolol combinados. A atropina aumenta VLF (GRÁFICO 9) e diminui tanto o LFnu quanto o HFnu (GRÁFICO 10) e o isoproterenol diminui VLF (GRÁFICO 9) e aumenta LFnu e HFnu (GRÁFICO 10).

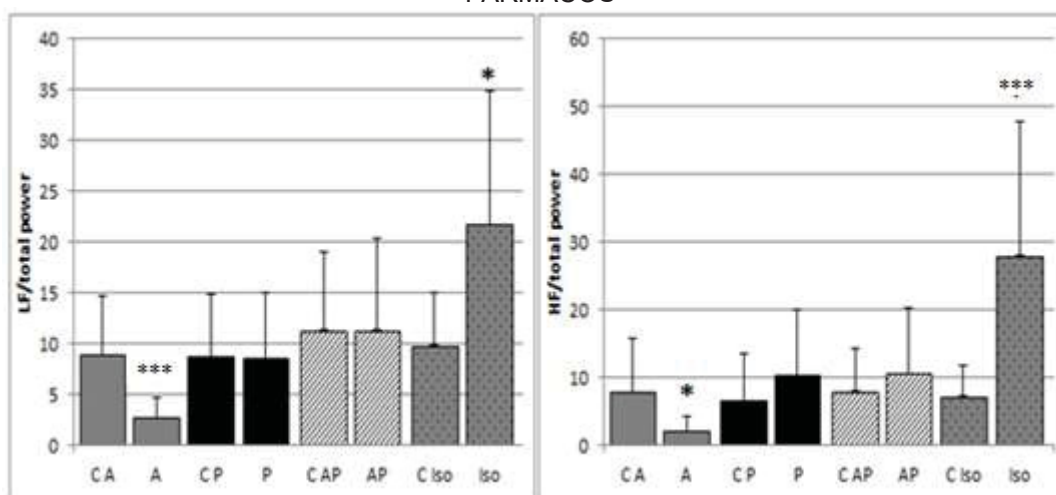
GRÁFICO 9 - VLF/TOTAL POWER APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS



FONTE: O autor (2018)

NOTA: Controle salina (CS), salina (S), controle atropina (CA) atropina (A), controle propranolol (CP), propranolol (P), controle atropina e propranolol (C AP), controle isoproterenol (C Iso), isoproterenol (iso), controle ivabradina (C Iva), ivabradina (Iva). ** Representa valor de p igual 0,01; *** Representa valor de p menor que 0,001

GRÁFICO 10 - LF/TOTAL POWER, HF/TOTAL POWER APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS



FONTE: O autor (2018)

NOTA: Controle salina (CS), salina (S), controle atropina (CA) atropina (A), controle propranolol (CP), propranolol (P), controle atropina e propranolol (C AP), controle isoproterenol (C Iso), isoproterenol (iso), controle ivabradina (C Iva), ivabradina (Iva). * Representa valor de $p < 0,05$; *** Representa valor de p menor que 0,001

Os valores do Plot de Poincaré, SD1 e SD2, foram reduzidos após administração de todos os fármacos, com exceção da ivabradina e salina. As reduções em SD1 e SD2 foram de 78% e 56%, respectivamente para a atropina, de 17,1% e 50% para o propranolol, de 77% e 80% para atropina e propranolol combinados, de 72% e 76,4% para o isoproterenol. A ivabradina aumentou o SD1 em 52,6% e não alterou o SD2.

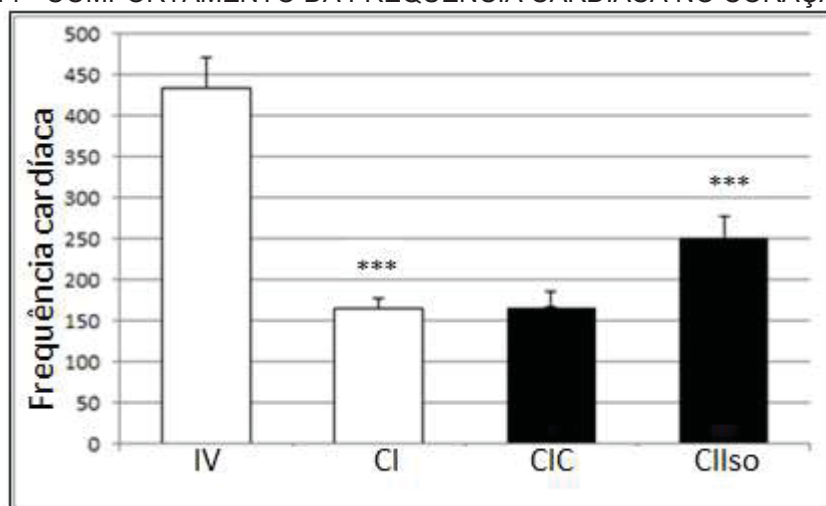
A *sample entropy* (SamEn) diminui após administração de atropina e

aumentou após administração de propranolol, isoproterenol e ivabradina. DFAa1 não foi alterada após administração de atropina, atropina combinada com propranolol, entretanto, diminui após administração de propranolol, isoproterenol e ivabradina. O índice DFAa2 foi aumentado após administração de atropina ou propranolol, e não sofreu alteração após administração de atropina e propranolol combinados, diminuiu com isoproterenol e não se alterou com ivabradina.

4.2 RESULTADOS DO ESTUDO RETROSPECTIVO (CORAÇÃO ISOLADO)

A análise da variabilidade da frequência cardíaca do coração isolado foi realizada comparando as variáveis de VFC *in vivo* e VFC do coração isolado dos mesmos animais. Também foi administrado isoproterenol (solução de Krebs-Henseleit com isoprotrenol em concentração de 100 nM), dose submáxima, na perfusão do coração isolado. A comparação *in vivo* x coração isolado foi realizada em 20 animais, enquanto a análise de coração isolado sem isoproterenol x coração isolado com isoproterenol foi realizada em 16 corações isolados.

GRÁFICO 11 - COMPORTAMENTO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO CORAÇÃO ISOLADO



FONTE: O autor (2018)

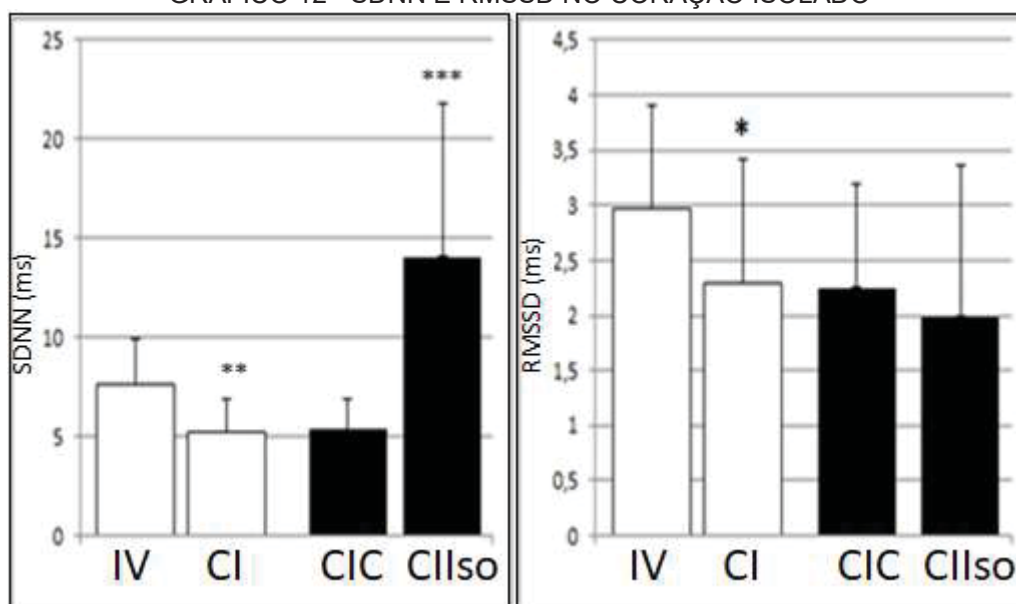
NOTA: *in vivo* (IV), coração isolado (CI), coração isolado sem isoproterenol (CIC), coração isolado com isoproterenol (CIIso). *** Representa valor de p menor que 0,001

As análises mostraram menores valores de FC (GRÁFICO 11), SDNN e RMSSD (GRÁFICO 12) no coração isolado quando comparados com esses índices *in vivo*. O SDNN é reduzido em 31,2% enquanto o RMSSD é reduzido em 22,8%. Após a administração de isoproterenol, há aumento na FC e no SDNN sem alteração

no RMSSD.

Observa-se grande diferença entre a FC *in vivo* e do coração isolado. Um dos fatores determinantes da VFC é a FC, inclusive alguns autores discutem a dependência matemática da VFC relativa a frequência cardíaca (TSUJI et al 1996, MONFREDI et al 2014). Se os índices supracitados forem normalizados pelos intervalos RR, como proposto por Sacha (2014), Sacha e Pluta (2008) e Sacha e Pluta (2005), as reduções do SDNN e RMSSD são de 74% e 71%, respectivamente.

GRÁFICO 12 - SDNN E RMSSD NO CORAÇÃO ISOLADO



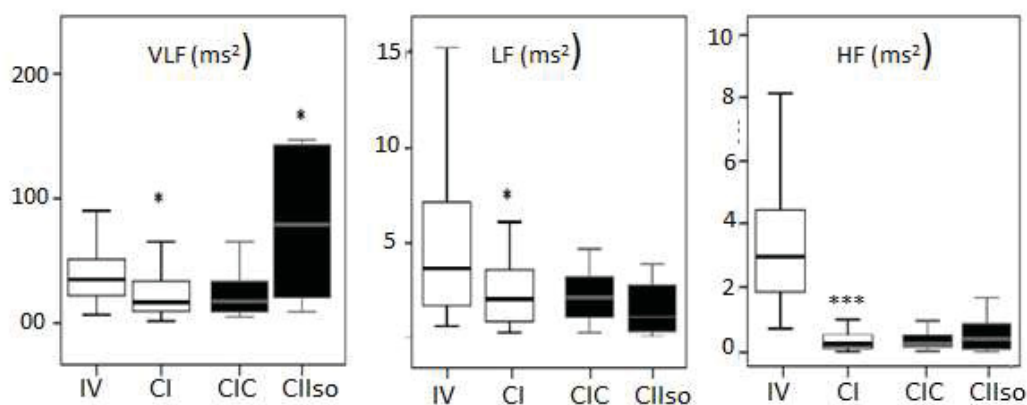
FONTE: O autor (2018)

NOTA: in vivo (IV), coração isolado (CI), coração isolado sem isoproterenol (CIC), coração isolado com isoproterenol (CIIso). * Representa valor de p menor que 0,05; ** Representa valor de p igual 0,01; *** Representa valor de p menor que 0,001

As três bandas de frequência se encontram diminuídas no coração isolado (GRÁFICO 13), sendo que a banda aparentemente mais alterada é a banda de alta frequência HF (redução de 91%). O VLF é reduzido em 43,5% e o LF é reduzido em 42%. Após administração de isoproterenol observa-se aumento de VFC, sem alteração nas bandas LF e HF.

Uma vez que a banda HF é reduzida em maior proporção, o índice LF/HF, assim como o índice LFnu se mostram aumentados. Após administração de isoproterenol, há redução de LF/HF e LFnu (GRÁFICO 14).

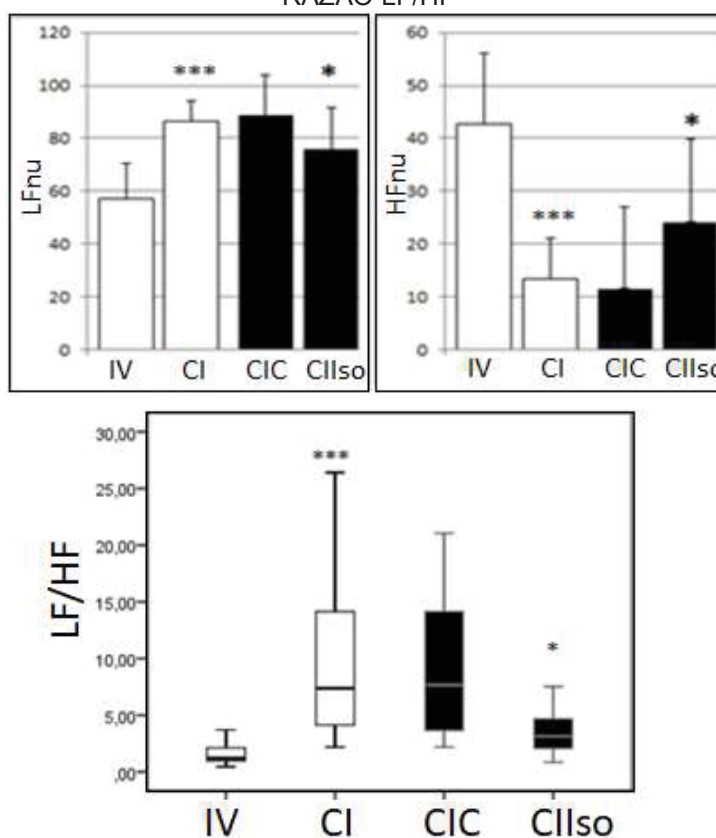
GRÁFICO 13 - ANÁLISE ESPECTRAL DO CORAÇÃO ISOLADO



FONTE: O autor (2018)

NOTA: in vivo (IV), coração isolado (CI), coração isolado sem isoproterenol (CIC), coração isolado com isoproterenol (CIIso). * Representa valor de p menor que 0,05; *** Representa valor de p menor que 0,001

GRÁFICO 14 - ANÁLISE ESPECTRAL DO CORAÇÃO ISOLADO, UNIDADES NORMALIZADAS E RAZÃO LF/HF



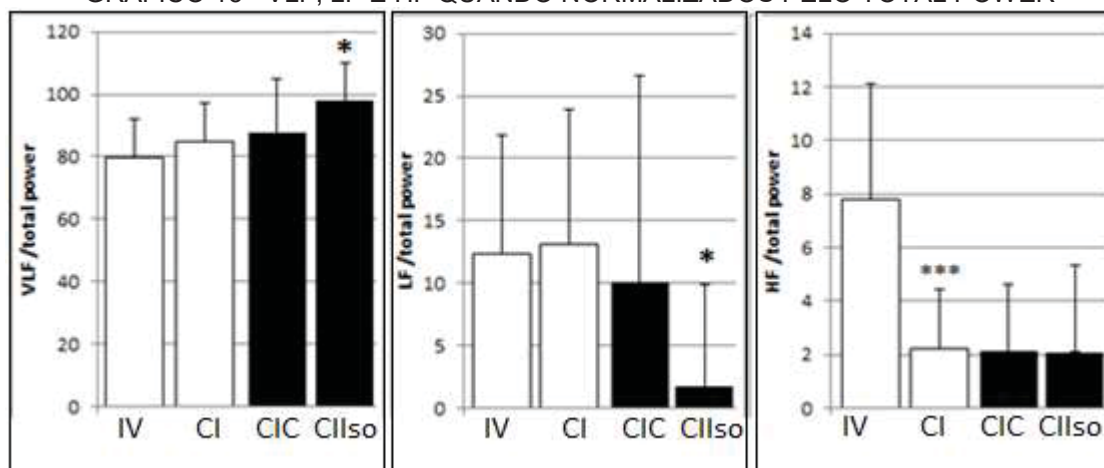
FONTE: O autor (2018)

NOTA: in vivo (IV), coração isolado (CI), coração isolado sem isoproterenol (CIC), coração isolado com isoproterenol (CIIso). * Representa valor de p menor que 0,05; *** Representa valor de p menor que 0,001

Quando os índices em unidades normalizadas são analisados com relação ao total power vemos que tanto o VLF quanto o LF não modificam a sua contribuição

para a variabilidade global no coração isolado, já o índice HF se mostra diminuído. Após administração de isoproterenol há aumento do VLF, diminuição do LF e manutenção dos valores de HF (GRÁFICO 15).

GRÁFICO 15 - VLF, LF E HF QUANDO NORMALIZADOS PELO TOTAL POWER



FONTE: O autor (2018)

NOTA: in vivo (IV), coração isolado (CI), coração isolado sem isoproterenol (CIC), coração isolado com isoproterenol (CIIsO). * Representa valor de p menor que 0,05; *** Representa valor de p menor que 0,001

O coração isolado, na análise não linear, apresentou valores reduzidos de SD1, SD2 e DFAa2, sem alterações nos índices SD2/SD1, SamEn e DFAa1. Após a administração de isoproterenol houve aumento do índice SD2, SD2/SD1, DFAa2 e diminuição do SamEn.

5 DISCUSSÃO

Credita-se a VFC ao SNA (VANDERLEI et al., 2009). Desta forma o presente estudo administrou diversos fármacos, agonista e antagonista adrenérgico e antagonista colinérgico, com o intuito de investigar a influência de cada ramo do SNA no coração. Como controle, foi utilizada salina, composto que não possui efeitos relativos a frequência cardíaca, e adicionalmente, utilizou-se ivabradina, bloqueador seletivo de corrente funny, fármaco cujo efeito principal é a bradicardia causada por meio de mecanismos não relacionados ao SNA (SILVA et al., 2016; BORER & HEUZEY, 2008).

Esses fármacos foram escolhidos uma vez que, no presente estudo, criou-se a hipótese de que a VFC seria alterada apenas por fármacos relacionados ao SNA, assim, os procedimentos de manipulação animal, como a injeção de fluidos *per se*, não alterariam a VFC.

A administração de salina não alterou a frequência cardíaca ou a variabilidade da frequência cardíaca, seja ela mensurada por índices lineares, não lineares, do domínio do tempo ou da frequência. Desta forma, concluímos que os resultados encontrados com os demais fármacos são de fato causados pela ação dos fármacos em receptores específicos presentes no coração, já que a manipulação por si só ou injeção de volume não causou alteração significativa.

A ivabradina é conhecida por seu efeito bradicárdico (BUCCHI et al., 2006; BOIS et al., 1996 SILVA et al., 2016). Seu efeito na frequência cardíaca é devido a sua ação como bloqueador da corrente marca-passo e não por meio dos receptores adrenérgicos e colinérgicos (SILVA et al., 2016; BORER & HEUZEY, 2008). No presente estudo a ivabradina reduziu significativamente a frequência cardíaca e, como esperado, não alterou as bandas de frequência da análise espectral nem o índice SDNN. O único índice alterado foi o RMSSD.

Outros estudos corroboram com os dados do presente estudo, como o de Dias da Silva et al., (2015) que avaliou a variabilidade da frequência cardíaca de ratos após administração de ivabradina. Neste a ivabradina causou bradicardia e não foi capaz de alterar os componentes da análise espectral. O estudo de Silva et al., (2016) avaliou a VFC e outras variáveis sob controle autonômico como pressão arterial e atividade do nervo simpático renal após a administração de ivabradina. Não

houve diferença entre ivabradina e placebo, desta forma os autores concluíram que a ivabradina não possui efeito por meio do sistema nervoso autônomo.

No presente estudo houve aumento do índice RMSSD após a administração de ivabradina. Como a ivabradina não atua nos receptores autonômicos do coração, como demonstrado por Dias da Silva et al., (2015) e Silva et al., (2016), foi criada a hipótese de que o aumento dos intervalos RR (redução da FC) foi responsável pela alteração desse índice, uma vez que Tsuji et al., (1996) e Sacha (2013) demonstraram que maiores intervalos RR permitem maior VFC, por questões matemáticas. Outros estudos mostraram aumentos no domínio do tempo após tratamento com ivabradina, como o de Kurtoglu et al., (2014) e o de Dias da Silva et al., (2015). No estudo de Dias da Silva o aumento da VFC apresentou forte correlação com as mudanças nos intervalos RR, reforçando a hipótese do presente estudo. Desta forma aumentos nos índices do domínio do tempo da VFC não devem ser interpretados inequivocamente em termos de balanço autonômico. Além disso, tratamento prolongado com ivabradina, como realizado por Kurtoglu et al., (2014), poderia também, de forma compensatória, causar alterações da modulação autonômica. No presente estudo, o uso da ivabradina não teve finalidade terapêutica, apenas foi utilizada como ferramenta para a análise das alterações de VFC em animal saudável. Concluímos, desta forma, que as mudanças causadas na VFC após a administração dos demais fármacos se devem a sua atuação nos receptores adrenérgicos e colinérgicos e não há mudanças de FC ou da manipulação dos animais.

As duas divisões do sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático, atuam no coração de formas distintas, sendo que o parassimpático diminui a frequência cardíaca e o simpático aumenta a frequência cardíaca (AIRES, 2010). No presente estudo houve aumento da FC após administração de isoproterenol e atropina, e redução da FC após administração de propranolol. Assim, os fármacos utilizados causaram as alterações esperadas. Quando atropina e propranolol foram administrados concomitantemente houve redução da FC.

Outros estudos observaram aumentos na FC após administração de isoproterenol, tanto em humanos (YERAGANI et al., 1999) quanto em animais (WHALEN e LEWIS, 1999). O estudo de Whalen e Lewis (1999) estudou os mecanismos, em ratos, pelos quais o isoproterenol causa aumentos na FC. Os autores demonstraram que o isoproterenol é um potente agonista dos receptores

adrenérgicos beta1, beta2 e beta3 e causa aumentos na frequência cardíaca mesmo após administração de atenolol.

No presente estudo, o uso do beta-bloqueador propranolol, diminui a FC. Os beta bloqueadores são fármacos utilizados no tratamento da hipertensão arterial e a bradicardia após sua administração é um fenômeno conhecido (BANGALORE, SAWHNEY E MESSERLI, 2008; MCALISTER et al., 2009). Em ratos, os nossos dados corroboram com os de Barbier et al., (2006), que observaram aumentos nos intervalos RR, diminuição da FC, após administração de propranolol.

De forma contrária, a atropina aumentou a FC. Em mamíferos neurotransmissores parassimpáticos ao se ligarem nos receptores muscarínicos, no coração, reduzem a frequência cardíaca. O bloqueio desses receptores com atropina, causa efeito contrário, ou seja, aumenta a FC (DHEIN, KOPPEN E BRODDE, 2001; BRODDE E MICHEL, 1999). A taquicardia induzida por atropina, em ratos, também é confirmada pelo estudo de Barbier et al., (2006).

Os dados do presente estudo se opõem aos de Blum, Carreiro & Hack (2013). Neste os autores administraram atropina a ratos previamente anestesiados com isoflurano. Neste estudo doses de 2mg/kg não modificaram a FC enquanto doses maiores causaram bradicardia, efeito contrário ao esperado. Entretanto diferentemente do estudo de Blum, Carreiro & Hack (2013) o presente estudo não utilizou ratos anestesiados uma vez que isoflurano pode reduzir a frequência cardíaca de forma dose dependente (YANG et al., 2014).

No presente estudo, avaliamos a frequência cardíaca após o bloqueio autonômico com atropina e propranolol combinados. Após bloqueio houve redução da frequência cardíaca, corroborando com o estudo de Barbier et al., (2006). O mesmo não acontece em humanos, onde a administração concomitante de atropina e propranolol causa aumentos da FC (JOSE & COLLISON, 1970). Em humanos, diferente de ratos, há predomínio do sistema nervoso parassimpático na modulação da frequência cardíaca basal, desta forma, é explicado o aumento da FC após administração concomitante de atropina e propranolol (CARNEVALI & SGOIFO, 2014).

No coração isolado, na ausência de modulação do sistema nervoso autônomo, também há redução significativa da frequência cardíaca quando comparada com a frequência cardíaca *in vivo*, corroborando com os dados de Mukhina, Dvornikov & Kamaidov (2000) que encontraram redução de 40% da

frequência cardíaca no coração isolado quando comparado com a de ratos anestesiados. A frequência cardíaca do coração humano, com influência diminuída do SNA, também pode ser mensurada em pacientes após transplante cardíaco, nesses há aumento da frequência cardíaca, reforçando a hipótese do predomínio vagal em humanos e predomínio simpático em rato (WACHTER et al., 2015).

A redução da frequência cardíaca após administração combinada de atropina e propranolol observada no presente estudo, (ao contrário do que ocorre em humanos onde há predomínio do ramo parassimpático), assim como a redução da FC no coração isolado, indicam uma forte participação do tono simpático no controle da frequência cardíaca em ratos.

O presente estudo confirma a grande contribuição do SNA na VFC. Tanto com o bloqueio de atropina e propranolol combinados, onde tanto os receptores adrenérgicos quanto os colinérgicos estão bloqueados diminuindo assim a influência do SNA no coração, quanto no coração isolado onde o mesmo é avaliado sem influência neuroendócrina, há redução significativa da VFC.

Relativo as divisões do SNA, é aceito que fenômenos que diminuam o tono parassimpático e/ou aumentem o tono simpático, reduzam a VFC (MALLIANI, LOMBARDI E PAGANI, 1994). Segundo Carnevali & Sgoifo (2014) indivíduos com tono vagal alto teriam maior resiliência ao stress e diversas outras situações, enquanto o contrário, baixo tono vagal e predominância simpática causaria menor capacidade adaptativa do coração deixando-o vulnerável a arritmias e diversas outras enfermidades. Os resultados do presente estudo concordam apenas parcialmente com essa afirmação.

Nos índices no domínio do tempo, a atropina, propranolol e isoproterenol reduziram todos os índices analisados. Esses resultados demonstram que, de fato, tanto o aumento do estímulo pelo ramo simpático (isoproterenol) quanto o bloqueio do ramo parassimpático (atropina) reduzem a VFC. Entretanto, no presente estudo, o bloqueio do ramo simpático (propranolol) também reduz a VFC, indicando que tanto o ramo simpático quanto o parassimpático são importantes para a modulação da VFC.

A rápida resposta do sistema nervoso parassimpático, especialmente pelo seu predomínio de inervação dos locais de automaticidade cardíaca, permite que o mesmo possa regular a função cardíaca batimento a batimento, o mesmo não acontece com o sistema nervoso simpático que possui ação um pouco mais lenta

(PUMPRLA et al., 2002). Dessa forma, vários índices que relacionam um intervalo RR com o intervalo RR adjacente podem representar a atuação do sistema parassimpático. Entre esses índices se encontram o RMSSD, que calcula o desvio padrão da diferença entre intervalos RR adjacentes e o NN50 (utilizado apenas em humanos pela duração do intervalo RR proposta) que subtrai um intervalo RR do intervalo RR seguinte e considera apenas os intervalos maiores que 50ms (PUMPRLA et al., 2002).

Com relação ao índice RMSSD, no presente estudo as maiores reduções foram após bloqueio parassimpático com atropina (78%) e administração do agonista simpático isoproterenol (72%). O bloqueador simpático propranolol foi o fármaco que teve menor influência sobre esse índice (redução de 17%), e mostrou resultados estatísticos limítrofes (0,051). Esses resultados apontam o RMSSD como um bom índice para avaliação do sistema parassimpático. Adicionalmente, no coração isolado não há alteração de RMSSD após administração de isoproterenol. O índice NN50 não foi calculado uma vez não se aplica a ratos, já que o baixo intervalo RR dos ratos não permite diferenças de 50ms.

Outros estudos realizados apresentaram resultados parecidos com o do presente estudo. O de Couderc et al., (2002) estudou a variabilidade da frequência cardíaca de ratos através de um sistema de telemetria. Os autores administraram atropina e propranolol, ambos via intraperitoneal com dose igual a 5mg/kg. Com relação às variáveis do domínio do tempo houve redução estatisticamente significativa do SDNN após administração tanto de atropina quanto de propranolol, o RMSSD reduziu em ambas as situações sem diferença significativa. Porém o estudo de Couderc et al., (2002) apresentou uma grande limitação relativa ao número de ratos (n=4) avaliados.

Em humanos, Polanczyk *et al.* (1998) administraram atropina, propranolol ou placebo em homens jovens saudáveis e relataram redução do SDNN e RMSSD após atropina e combinação de atropina e propranolol. A administração sozinha de propranolol não causou mudanças significativas desses índices ao contrário do que ocorreu no presente estudo. Foi teorizado que essas diferenças ocorrem uma vez que em humanos existe um predomínio parassimpático do controle autonômico cardíaco (CARNEVALI & SGOIFO, 2014) ao contrário do que acontece com os ratos, onde há predomínio simpático, como observado pelos dados de frequência cardíaca intrínseca do presente estudo, assim como de estudos similares onde

atropina e propranolol foram administrados concomitantemente (BARBIER et al., 2006).

A redução da VFC após administração de isoproterenol é corroborada pelo estudo de Ahmed et al., (1994) que, em humanos, demonstraram que a estimulação adrenérgica, seja pela administração de isoproterenol ou pela realização de exercício físico e *tilt-test* reduz SDNN e RMSSD.

Os resultados do presente estudo, desta forma, demonstram que tanto o sistema simpático quanto o parassimpático são importantes na modulação da VFC, e o desequilíbrio desses sistemas causa redução da VFC. Essa hipótese é corroborada por estudos relativos a enfermidades cardíacas onde há aumento do tono simpático com concomitante redução da VFC, como no infarto agudo do miocárdio, e a VFC é restaurada após administração de propranolol (LAMPERT et al., 2003), porém, a administração de propranolol sozinha, em indivíduos saudáveis, causa redução em alguns índices da variabilidade da frequência cardíaca (POMERANZ et al., 1985; COUDERC et al., 2002).

No presente estudo foi realizada a análise espectral da VFC. A análise espectral é uma das formas mais comuns de análise da VFC, utilizada como ferramenta para investigação do sistema nervoso autônomo no coração (MALLIANI, LOMBARDI & PAGANI, 1994; KUWAHARA et al., 1994; AUBERT et al., 1999), entretanto, em ratos, é comum encontrar estudos onde o controle autonômico é mensurado por meio do teste de sensibilidade do barorreflexo (IRIGOYEN E KRIEGER, 1998; MOSTRADA et al., 2014). A decomposição do tacograma em bandas de frequência permite melhor compreensão dos mecanismos autonômicos envolvidos na modulação da VFC (RASSI JR, 2000).

Apesar de pouco consenso a respeito do índice VLF, este se mostrou um marcador com excelente Valor prognóstico em pacientes com doenças cardíacas (HADASE et al., 2004). A relação entre VLF e doenças cardíacas deve-se, segundo Usui e Nishida (2017), ao fato do VLF se alterar após atividade estressora. Segundo esses autores, atividades estressoras aumentam a atividade do sistema renina-angiotensina, aumentando o ramo simpático e diminuindo o ramo parassimpático.

Em humanos a administração de atropina reduz o VLF enquanto que a administração de Enalaprit, inibidor da enzima conversora de angiotensina, aumenta esse índice (TAYLOR et al., 1998). Esses autores observaram também aumentos do VLF após administração de propranolol, porém esse aumento se deve aos

resultados desproporcionais de apenas um dos indivíduos avaliados que não foi retirado da análise mesmo apresentando valores considerados *outliers*.

Os resultados do presente estudo mostram a influência do SNA nesse índice. Houve redução do VLF após administração de todos os fármacos, sendo que as maiores alterações foram encontradas após administração de atropina, isoproterenol, ou a combinação de atropina e propranolol, concordando em partes com o estudo de Taylor et al., (1998). Assim, em ratos, o índice VLF parece ser influenciado de forma direta ou indireta pelo SNA.

Não foram encontrados outros estudos com ratos a fim de explicar a influência do SNA no índice VLF.

Os índices LF e HF, ao contrário do índice VLF, são mais discutidos na literatura e seus significados fisiológicos mais estabelecidos. Desses, o índice HF é o índice mais bem definido e há um consenso sobre seu significado fisiológico, sendo considerado um índice que reflete a atividade do ramo parassimpático (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996; BILLMAN, 2011; LOMBARDI; STEIN, 2011; HEATHERS). Desta forma era esperado maiores alterações na banda de alta frequência após a administração da atropina e de isoproterenol e as menores alterações após a administração de propranolol.

O índice LF, embora extensivamente discutido na literatura, ainda é alvo de discordância. Alguns autores o consideram como uma medida do ramo simpático (MALLIANI et al., 1991), como uma medida que representa o ramo simpático e parassimpático combinados (HOULE E BILLMAN, 1999) ou como uma medida que avalia a modulação da VFC através do barorreflexo (GOLDSTEIN et al., 2012). Era esperado, no presente estudo que tanto a atropina quanto o propranolol reduzissem LF enquanto o isoproterenol o aumentasse.

No presente estudo para o índice HF foi reduzido em 93,7%, 41,9% e 92% após administração de atropina, propranolol e isoproterenol respectivamente. Já o LF foi reduzido em 94%, 65% e 92%. Como esperado, a administração de atropina reduz tanto LF quanto HF na mesma proporção enquanto que a administração de propranolol atua principalmente no índice LF, mostrando a influência simpática nesse índice, e atua de forma menos proeminente no índice HF, mostrando assim que o índice HF tem menor influência do ramo simpático.

A partir dos resultados encontrados no presente estudo, acreditamos que

tanto o LF quanto o HF estão sob influência do ramo parassimpático, sendo que o índice HF está sob maior influência do ramo parassimpático e mínima influência simpática. Fármaco que causa diminuição da atividade simpática no coração, como o propranolol, altera de maneira mais intensa a banda LF e impacta o índice LF/HF, demonstrando repercussão dessa banda com diminuição da atividade simpática, contudo, o aumento esperado dessa banda em decorrência de hiperestimulação simpática, com o uso de isoproterenol, não foi observada, sugerindo que o índice pode refletir com maior precisão alterações menores da estimulação simpática ou seu bloqueio, enquanto não se mostra um índice linear para demonstrar estímulos de alta intensidade.

Outros estudos apresentaram resultados semelhantes ao do presente estudo, tanto em humanos (POMERANZ et al., 1985) quanto em ratos (BARBIER et al., 2006).

Pomeranz et al., (1985) relatou decréscimos no índice LF e HF após administração de atropina, o índice HF foi quase inteiramente abolido e o LF foi reduzido em 84%. Após administração de propranolol reduziu o LF em 72% enquanto o índice HF não foi afetado pelo propranolol.

Barbier et al., (2006) demonstraram, em ratos, que a administração de atropina causa reduções no LF e HF. Entretanto a administração de propranolol reduziu apenas LF. Ao contrário dos dados do presente estudo a redução do índice HF não foram estatisticamente significativas.

Os estudos de Pomeranz et al., (1998) e Barbier et al., (2006), ao contrário do presente estudo, não encontraram alterações no índice HF após a administração de propranolol. No caso do estudo de Pomeranz et al., (1998) atribuímos essa diferença ao fato do estudo supracitado ter avaliado a VFC em humanos, onde há predomínio parassimpático na modulação da FC (CARNEVALI E SGOIFO, 2014). Em ratos, como exposto pelo presente estudo, o ramo simpático se mostrou predominante na modulação da FC. O estudo de Barbier et al., (2006) não apresentou diferenças no índice HF após administração de propranolol, entretanto quando a razão LF/HF foi avaliada, demonstrou-se que a administração de propranolol não reduz esse índice de forma significativa. Se houve redução de LF, era esperado que o índice LF/HF também fosse reduzido. O fato desse índice não reduzir indica que houve alguma redução concomitante de HF, apesar da análise estatística não demonstrar.

Apesar dos estudos de Pomeranz et al., (1985) e Barbier et al., (2006) não demonstrarem reduções de HF após atropina, Billman (2013) em uma revisão de literatura diz que o LF e o HF são modulados pelas duas divisões do sistema nervoso autônomo. Segundo Billman (2013) o LF é composto pelo ramo simpático, ramo parassimpático e outros fatores desconhecidos, e o HF é composto em sua maior parte pelo ramo parassimpático e em menor parte pelo simpático. Assim os bloqueios autonômicos farmacológicos podem acontecer em ambas as bandas de frequência, mesmo se apenas uma das divisões do sistema nervoso autônomo for bloqueada, como aconteceu no presente estudo. Essa sobreposição do SNA nas bandas de frequência se mostrou mais evidente no presente estudo.

O estudo de Li et al., (2008), corrobora com os resultados do presente e com Billman (2013). Li et al., (2008) também encontrou redução da banda de alta frequência (HF) após administração oral de propranolol. Porém o estudo foi realizado em cães.

Em algumas situações pode ocorrer redução concomitante de LF e HF, sendo o exercício o exemplo mais comum. Neste caso além da análise espectral em unidades absolutas, há indicação de se analisar essas variáveis em unidades normalizadas (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996). No presente estudo ocorreram reduções em todas as bandas de frequência (tanto *in vivo* quanto no coração isolado), assim a análise espectral em unidades normalizadas também foi realizada.

Em unidades normalizadas, LFnu e HFnu não foram alterados após administração concomitante de atropina e propranolol. Uma vez que ambos os índices foram reduzidos, na mesma magnitude, em unidades absolutas, era esperado que os mesmos não fossem alterados em unidades normalizadas.

A atropina quando administrada sozinha causa pouca diminuição no HFnu. A pequena diminuição do HFnu pode se dever a dois fatores teorizados no presente estudo: primeiramente a administração de atropina causou alterações de mesma magnitude nas bandas LF e HF quando expressas em unidades absolutas (portanto não influenciando na unidade normalizada) e segundo, o valor de HFnu, apresenta valores baixos na VFC basal (devido ao predomínio de estímulo simpático), logo as mesmas considerações sobre a maior atuação do sistema simpático na modulação da frequência cardíaca discutidas durante a análise dos índices de VFC do domínio

de tempo podem ser aplicadas.

O LFnu diminuiu após administração do antagonista simpático propranolol, mostrando a influência do sistema simpático sobre essa banda, entretanto após administração do agonista simpático isoproterenol não ocorreu aumento no LFnu, e sim redução. Como o LF e consequentemente o LFnu são índices considerados, por alguns autores, como marcadores de atividade simpática (BLUR, 2007), era esperado que a administração de isoproterenol aumentasse esses índices, ao contrário do observado com a administração de propranolol. No coração isolado resultados similares foram encontrados após a administração de isoproterenol, onde o índice LF não é aumentado e sim reduzido. Os valores de LF em unidades normalizadas, assim como ocorreu nesse índice em unidades absolutas, sugere que o índice pode refletir com maior precisão alterações menores da estimulação simpática ou seu bloqueio, enquanto não se mostra um índice linear para demonstrar estímulos de alta intensidade.

As unidades normalizadas também foram calculadas a partir do total power, sem a exclusão do VLF. Nessa situação não houve alteração em nenhum dos índices após administração de propranolol ou atropina e propranolol combinados. A administração de atropina causou diminuição tanto na banda de alta frequência quanto na banda de baixa frequência. Contrariamente o isoproterenol causou aumento nessas duas bandas. No coração isolado o isoproterenol diminuiu o LF e não causou alterações no HF.

As discrepâncias dos resultados encontrados após administração de propranolol e isoproterenol (antagonista e agonista simpático), assim como os resultados após administração de isoproterenol no coração isolado, mostram que a análise espectral não parece ser um bom recurso para quantificar a atuação do sistema nervoso simpático, especialmente em casos de hiperestimulação como utilizado no presente estudo. Como cita Kleiger, Stein e Bigger (2005) as várias manipulações dos índices da análise espectral, calculados a fim de quantificar a atuação das divisões do sistema nervoso autônomo são ingênuas e baseadas modelo *ying-yang* simplista de atuação do sistema nervoso autônomo.

A afirmação de que o LF é um índice que reflete a atividade simpática já foi contestada por diversos autores.

Hopf et al., (1995) avaliou a VFC no domínio da frequência, após anestesia epidural torácica, bloqueio pré ganglionar simpático, em indivíduos em supino e

durante o tilt-test. Apesar da anestesia impedir o aumento da razão LF/HF durante o tilt-test a mesma não foi capaz de alterar a banda de frequência LF durante o teste ou supino, levando os autores a concluir que a banda de baixa frequência não é um índice específico de atividade do sistema simpático.

Há evidências de que a administração de isoproterenol possa aumentar o tono parassimpático como no estudo de Arnold e McDevitt (1984) que analisou mudanças na frequência cardíaca, pressão arterial diastólica, sistólica e média causadas por infusão contínua de isoproterenol antes e após administração de atropina. Porém, nenhum dos outros índices que estão relacionados ao sistema nervoso parassimpático, RMSSD e SD1 foram alterados de forma a indicar aumento do tono parassimpático. O estudo de Arnold e McDevitt (1984) contraria o estudo de Briant et al., (1973) que diz que a infusão de isoproterenol atua não apenas através da estimulação do sistema simpático, mas também através da retirada do tono parassimpático. No presente estudo, ao contrário do estudo de Arnold e McDevitt (1984), a infusão de isoproterenol foi realizada em bolus único, e não com infusão contínua. A infusão contínua utilizada por esses autores pode ter desencadeado uma resposta reflexa do sistema parassimpático.

Houle e Billman (1999) separaram 71 cachorros em dois grupos, após oclusão da coronária por 2 minutos precedida de exercício físico, os animais resistentes que não apresentaram arritmias e os susceptíveis que apresentaram arritmias. Segundo os autores, intervenções que possam aumentar a atividade simpática deveriam causar aumentos no LF, e, ainda como maior atividade simpática está correlacionada a maior chance de arritmias, um maior LF seria encontrado em animais susceptíveis a arritmias. A frequência cardíaca aumentou em todas as intervenções que produzem aumentos simpáticos, entretanto o LF diminuiu, especialmente nos animais susceptíveis. Os autores concluíram que o LF é um índice ineficiente para refletir atividade simpática.

Outra possibilidade de explicação para a discrepância dos resultados observados após a administração de antagonista e agonista simpático, é que o índice LF em unidades absolutas ou unidades normalizadas reflete, em parte, a atividade do ramo simpático, porém não de forma direta, como propõe Goldstein et al., (2012). Segundo esse autor o LF é uma medida de avaliar a modulação da VFC por meio do barorreflexo e por isso não reflete diretamente a atividade simpática.

Quando as medidas de variabilidade de parâmetros cardiovasculares são

mensuradas, não por meio dos intervalos RR, mas por meio das oscilações na pressão arterial (variabilidade da pressão arterial VPA), o componente de baixa frequência da análise espectral corresponde a modulação de aferentes autonômicos aos vasos (PAGANI et al., 1996) sendo, segundo Sleight et al., (1995) a análise espectral da VPA um índice que representa o barorreflexo. Assim, sugerimos que a banda de baixa frequência, seja ela avaliada pela VFC ou pela VPA, tenham a mesma origem, assim como a banda VLF (LEOR-LIBRACH et al., 2002). Segundo Leor-Librach et al., (2002) a banda de frequência muito baixa, calculada tanto pelo VFC quanto pela VPA possuem a mesma origem, ou seja, são controladas pelos mesmos controladores autonômicos.

O barorreflexo é um sistema de controle de pressão arterial que envolve tanto o sistema simpático como o parassimpático, permitindo que a pressão se mantenha em níveis estreitos (AIRES, 2008). Por exemplo, após a administração de fenilefrina, fármaco α -agonista que possui ação vasoconstritora causando aumentos da pressão arterial, há uma resposta do ramo parassimpático reduzindo a FC, a fim de retornar a pressão arterial a níveis basais. De forma oposta, a administração de nitroprussiato de sódio, vasodilatador, causa taquicardia reflexa (SILVA, 2015). Infelizmente, o barorreflexo não foi avaliado no presente estudo para que pudéssemos inferir sobre alterações da banda de baixa frequência da pressão arterial como marcador de estímulo simpático.

Com relação a análise não linear da VFC, nenhum índice conseguiu discriminar de forma precisa a atuação dos ramos do SNA.

Os índices do Plot de Poincaré possuem correlação forte com os índices no domínio do tempo, ou seja, se houver alterações no SDNN, alterações na mesma magnitude são esperadas no SD2. Da mesma forma alterações no SD1 acompanham as alterações no RMSSD. Outros índices também foram calculados no presente estudo, como: *sample entropy* (SamEn) e os índices de análise de flutuações destendenciadas DFA α 1 e DFA α 2.

A administração de salina ou atropina e propranolol combinados não modificou nenhum desses índices. Atropina sozinha diminuiu a entropia (SamEn) e aumentou DFA α 2. Os aumentos em DFA α 1 não foram estatisticamente significativos. De forma oposta a administração de propranolol aumentou SamEn e diminuiu DFA α 1 e DFA α 2, mostrando que a atropina e o propranolol possuem ações opostas nesses índices não lineares. Entretanto após a administração de

isoproterenol o mesmo comportamento causado pelo propranolol foi observado. A ivabradina houve aumento da entropia SamEn e diminuição do DFA α 1.

Bolea et al., (2014) avaliou a VFC utilizando índices não lineares em homens saudáveis após bloqueio autonômico com atropina e propranolol. Houve aumento do SamEn após administração de atropina, no entanto nenhuma alteração foi observada após administração de propranolol.

Castiglioni et al., (2011) encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo onde a administração de atropina causou aumento nos índices da análise de flutuações destendenciadas. Entretanto não foi encontrada diferenças após administração de propranolol apesar da média dos valores desses índices diminuir.

No presente estudo os índices não lineares da VFC não forneceram informações adicionais sobre a atuação de cada divisão do sistema nervoso autônomo. Como poucos estudos a respeito desses índices foram realizados em modelo animal, sugere-se que mais estudos sobre análises não lineares são necessários.

Corroborando com os estudos de Janousek et al., (2010) e Frey et al., (1996) as análises com coração isolado, do presente estudo, mostram reduções em todos os índices da VFC. Nos índices no domínio do tempo o SDNN e o RMSSD foram reduzidos em 31,2% e 22,8% respectivamente. Uma vez que o coração isolado está sem influência de outros sistemas, seria esperado uma maior redução nesses índices, entretanto como a FC do coração isolado se mostrou muito menor que a FC *in vivo*, existe a possibilidade da VFC do coração isolado não ter se mostrado tão baixa por questões matemáticas. Uma vez que maiores intervalos RR (menor FC) permitem maiores variabilidade (SACHA, 2013; TSUJI, 1996) é proposto por Sacha (2013) que a normalização dos índices da VFC pelos intervalos RR, diminuem essa dependência matemática. Após esse artifício matemático, as reduções dos índices SDNN e RMSSD foram de 74% e 71%. Nos índices do domínio da frequência, a maior redução foi no índice HF (91%). Os índices VLF e LF foram reduzidos em 43,5% e 42% respectivamente. O estudo de Janousek et al., (2010) também mostrou as maiores reduções na banda de alta frequência (93%).

A partir desses resultados supõe-se que parte da modulação da VFC seja intrínseca do coração. O índice HF, de fato, parece estar sobre maior influência da

função autonômica, em especial o sistema parassimpático como demonstrado no presente estudo. Segundo Billman (2013) o índice HF é composto em 90% pelo ramo parassimpático e em 10% pelo ramo simpático, porém nossos resultados mostram que existe uma porcentagem de contribuição do próprio coração isolado. Esses mecanismos intrínsecos de regulação são evidenciados por outros autores que demonstraram haver índice HF, ainda que reduzido, em pacientes transplantados (RAMAEKERS et al., 1996; BERNARDI et al., 1990).

Segundo Billman (2013) e Billman (2010) o índice LF é composto pelo sistema simpático, parassimpático e por fatores ainda não conhecidos. Billman (2013) propõe que o ramo parassimpático seria responsável por 25% do índice LF enquanto que o parassimpático seria responsável por 50%, sendo que os 25% seriam fatores não conhecidos. Embora em proporções diferentes, o presente está de acordo com o proposto por Billman (2013). Tanto a administração de atropina quanto de propranolol altera esse índice, mostrando influência dos ramos parassimpático e simpático. Quanto aos fatores ainda não conhecidos que compõem a banda de baixa frequência, o presente estudo propõe que o mesmo se deve a mecanismos intrínsecos do coração, uma vez que este índice foi reduzido em apenas 42% nas análises do coração isolado.

O índice VLF foi reduzido em 42% no coração isolado, mostrando que, assim como o LF, mecanismos intrínsecos de regulação podem modular esse índice. Quando os índices do domínio da frequência são normalizados pelo total power o VLF representa 84,7% da análise espectral. Apesar de menos discutido na literatura, o índice VLF, dos índices do domínio da frequência, se mostrou um excelente marcador prognóstico para doenças cardiovasculares (HADASE *et al.*, 2004). Usui & Nishida, (2017) associam a relação entre o VLF e doenças cardiovasculares ao fato desse índice diminuir após atividade estressora. Segundo esses autores atividades estressoras estimulam o sistema renina-angiotensina e aumentam o ramo simpático. Entretanto a presença significativa desse índice no coração isolado não deve ser desconsiderada, desta forma, o presente estudo sugere que o VLF, diminuído em algumas doenças cardiovasculares, poderia dever-se em parte, a perda de propriedades intrínsecas do coração. Futuras investigações poderiam ser destinadas a investigar os eventos responsáveis por essa banda.

Alguns autores teorizam que a VFC diminuída em algumas enfermidades deve-se ao fato de que estados patológicos criam um ambiente desfavorável para as

células cardíacas que pode afetar o funcionamento dos canais iônicos (PAPAIOANNOU et al., 2013). Sabe-se que diversas enfermidades estão associadas a disfunções em canais iônicos (DONG, BAI E CAI, 2016; WATANABE et al., 2008), ou nas junções comunicantes (SEVERS, 1994) e que as disfunções de propriedades intrínsecas de alguns canais levam a redução da VFC (YANIV, LYASHKOV E LAKATTA, 2014).

As formas de análise de VFC ainda não são sensíveis a ponto de identificar a contribuição das propriedades intrínsecas do coração.

Por fim, o presente estudo não mensurou diretamente a atividade simpática e parassimpática através da atividade neural desses dois sistemas, assim como não mensurou frequência respiratória dos animais e a pressão arterial dos animais, fatores esses que podem influenciar os resultados da VFC. Outro fator limitante foi a utilização de uma única dose de isoproterenol. A dose alta utilizada causa aumento excessivo da FC reduzindo muito os intervalos RR o que pode interferir matematicamente na análise. Relativo ao coração isolado um fator limitante foi a ausência de um agonista parassimpático e também da análise de doses incrementais sobre as variáveis.

6 CONCLUSÃO

Existe predomínio simpático de estimulação cardíaca basal *in vivo* em ratos, demonstrado pela redução da frequência cardíaca em coração isolado e pela redução drástica da frequência cardíaca após duplo bloqueio com atropina e propranolol.

A intensa influência do sistema nervoso autônomo na variabilidade da frequência cardíaca foi confirmada no presente estudo, uma vez que a ivabradina não causou alteração na VFC, mas bloqueadores de receptores simpático e parassimpático o fizeram. Contudo, existem mecanismos intrínsecos influenciando variáveis da VFC não dependentes do SNA, como confirmado por meio da análise da VFC do coração isolado.

Tanto o bloqueio de receptores simpáticos quanto parassimpáticos causam redução em índice de variabilidade da frequência cardíaca global. Tanto o LF quanto o HF estão sob influência do ramo parassimpático, sendo que o índice HF está sob maior influência do ramo parassimpático e mínima influência simpática. A diminuição da atividade simpática no coração alterou de maneira mais intensa a banda LF e impactou o índice LF/HF, contudo, o aumento esperado desta banda em decorrência de hiperestimulação simpática (uso de isoproterenol) não foi observada, sugerindo que o índice pode refletir com maior precisão alterações menores da estimulação simpática ou seu bloqueio, enquanto não se mostra um índice linear para demonstrar estímulos de alta intensidade. Assim, as análises tanto *in vivo* quanto no coração isolado corroboram com a teoria de que a banda de baixa frequência, não é discriminativa da atividade simpática do SNA.

Trabalhos futuros utilizando doses diferentes e progressivas de agonistas adrenérgicos podem ser realizados a fim de elucidar como a VFC é alterada durante estímulos simpáticos crescentes. Estudos adicionais são recomendados para avaliação da influência intrínseca do coração nos mecanismos de VFC, explorando o uso de agonistas e antagonistas de receptores do SNA em coração isolado, assim como, o desenvolvimento de métodos de análise da VFC alternativos na tentativa de identificar com melhor precisão a influência dos ramos do SNA sobre o controle cardiovascular.

REFERÊNCIAS

- ACCILI, E. A.; PROENZA, C.; BARUSCOTTI, M.; DIFRANCESCO, D. From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. **Physiology**, v. 17, n. 1, p. 32-37, 2002.
- ACHARYA, R. U.; LIM, C. M.; JOSEPH, P. Heart rate variability analysis using correlation dimension and detrended fluctuation analysis. **ITBM-RBM**, v. 23, n. 6, p. 333-339, 2002.
- ACHARYA, U. R.; JOSEPH, K. P.; KANNATHAL, N.; LIM, C. M.; SURI, J. S.; Heart rate variability: a review. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 44, n. 12, p. 1031-1051, 2006.
- AHMED, M. W.; KADISH, A. H.; PARKER, M. A.; GOLDBERGER, J. J. Effect of physiologic and pharmacologic adrenergic stimulation on heart rate variability. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 24, n. 4, p. 1082-1090, 1994.
- APPEL, M. L.; BERGER, R. D.; SAUL, J. P.; SMITH, J. M.; COHEN, R. J. Beat to beat variability in cardiovascular variables: noise or music?. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 14, n. 5, p. 1139-1148, 1989.
- ARNOLD, J. M.; MCDEVITT, D. G. Vagal activity is increased during intravenous isoprenaline infusion in man. **British journal of clinical pharmacology**, v. 18, n. 3, p. 311-316, 1984.
- AUBERT, A.E.; SEPS, B.; BECKERS, F. Heart rate variability in athletes. **Sports Med**, v. 33, n. 12, p.889-919, 2003.
- AUBERT, A. E.; RAMAEKERS, D.; BECKERS, F.; BREEM, R.; DENEFF, C.; VAN DE WERF, F.; ECTOR, H. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 60, n. 3, p. 197-213, 1999.
- BANGALORE, S.; SAWHNEY, S.; MESSERLI, F. H. Relation of beta-blocker-induced heart rate lowering and cardioprotection in hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 18, p. 1482-1489, 2008.
- BARBIER, J.; RELAND, S.; VILLE, N.; RANNOU-BEKONO, F.; WONG, S.; CARRÉ, F. The effects of exercise training on myocardial adrenergic and muscarinic receptors. **Clinical Autonomic Research**, v.16, n. 1, p. 61-65, 2006.
- BELL, R. M.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 50, n. 6, p. 940-950, 2011.
- BEHAR, J.; GANESAN, A.; ZHANG, J.; YANIV, Y. The Autonomic Nervous System Regulates the Heart Rate through cAMP-PKA Dependent and Independent Coupled-Clock Pacemaker Cell Mechanisms. **Frontiers in physiology**, v. 7, 2016.

BERNARDI, L.; SALVUCCI, F.; SUARDI, R.; SOLDÁ, P. L.; CALCIATI, A.; PERLINI, S.; RICCIARDI, L. Evidence for an intrinsic mechanism regulating heart rate variability in the transplanted and the intact heart during submaximal dynamic exercise?. **Cardiovascular research**, v. 24, n. 12, p. 969-981, 1990.

BERNTSON, G. G.; CACIOPPO, J. T.; QUIGLEY, K. S. Respiratory sinus arrhythmia: autonomic origins, physiological mechanisms, and psychophysiological implications. **Psychophysiology**, v. 30, n. 2, p. 183-196, 1993.

BILLMAN, G. E. Heart rate variability—a historical perspective. **Frontiers in physiology**, v. 2, 2011.

BILLMAN, G. E. The LF/HF ratio does not accurately measure cardiac sympatho-vagal balance. **Frontiers in physiology**, v. 4, 2013.

BLUM, J.; CARREIRO, S.; HACK, J. Difficulty creating an Anticholinergic rat model with atropine. **Clinical Toxicology**, v. 51, n. 9, p. 910-910, 2013.

BOIS, P.; BESCOND, J.; RENAUDON, B.; LENFANT, J. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. **British journal of pharmacology**, v. 118, n. 4, p. 1051-1057, 1996.

BRIANT, R. H.; DOLLERY, C. T.; FENYVESI, T.; GEORGE, C. F. Assessment of selective β -adrenoceptor blockade in man. **British journal of pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 106-114, 1973.

BROWN, H. F.; DIFRANCESCO, D.; NOBLE, S. J. How does adrenaline accelerate the heart?. **Nature**, v. 280, n. 5719, p. 235-236, 1979.

BUCCHI, A.; TOGNATI, A.; MILANESI, R.; BARUSCOTTI, M.; DIFRANCESCO, D. Properties of ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels. **The Journal of physiology**, v. 572, n. 2, p. 335-346, 2006.

BURR, R. L. Interpretation of normalized spectral heart rate variability indices in sleep research: a critical review. **Sleep**, v. 30, n. 7, p. 913-919, 2007.

CALISTER, F. A.; WIEBE, N.; EZEKOWITZ, J. A.; LEUNG, A. A.; ARMSTRONG, P. W. Meta-analysis: β -blocker dose, heart rate reduction, and death in patients with heart failure. **Annals of Internal Medicine**, v. 150, n. 11, p. 784-794, 2009.

CAPOTE, Andrielle Elaine. **Efeitos do Diabetes mellitus experimental sobre a evolução temporal da variabilidade da frequência cardíaca**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

COOPER, T. M.; MCKINLEY, P. S.; SEEMAN, T. E.; CHOO, T. H.; LEE, S.; SLOAN, R. P. Heart rate variability predicts levels of inflammatory markers: Evidence for the vagal anti-inflammatory pathway. **Brain, behavior, and immunity**, v. 49, p. 94-100, 2015.

COUDERC, J. P.; ELDER, A.; COX, C.; ZAREBA, W.; OBERDORSTER, G. Limitations of power-spectrum and time-domain analysis of heart rate variability in short-term ECG recorded using telemetry in unrestrained rats. In: **Computers in Cardiology**, 2002. IEEE, 2002. p. 589-592.

CURTIS, M. J.; MACLEOD, B. A.; TABRIZCHI, R.; WALKER, M. J. A. An improved perfusion apparatus for small animal hearts. **Journal of pharmacological methods**, v. 15, n. 1, p. 87-94, 1986.

DEEDWANIA, P. Selective and specific inhibition of If with ivabradine for the treatment of coronary artery disease or heart failure. **Drugs**, v. 73, n. 14, p. 1569-1586, 2013.

DEKKER, J. M.; CROW, R. S.; FOLSOM, A. R.; HANNAN, P. J.; LIAO, D.; SWENNE, C. A.; SCHOUTEN, E. G. Low heart rate variability in a 2-minute rhythm strip predicts risk of coronary heart disease and mortality from several causes The ARIC Study. **Circulation**, v. 102, n. 11, p. 1239-1244, 2000.

DIAS, F. A.; WALKER, L. A.; ARTEAGA, G. M.; WALKER, J. S.; VIJAYAN, K.; PEÑA, J. R.; WOLSKA, B. M. The effect of myosin regulatory light chain phosphorylation on the frequency-dependent regulation of cardiac function. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 41, n. 2, p. 330-339, 2006.

DIAS DA SILVA, V. J.; TOBALDINI, E.; ROCCHETTI, M.; WU, M. A.; MALFATTO, G.; MONTANO, N.; ZAZA, A. Modulation of sympathetic activity and heart rate variability by ivabradine. **Cardiovascular research**, v. 108, n. 1, p. 31-38, 2015.

DIFRANCESCO, D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. **Annual review of physiology**, v. 55, n. 1, p. 455-472, 1993.

DiFRANCESCO, D. TROMBA, C. Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes. **The Journal of physiology**, v. 405, n. 1, p. 477-491, 1988.

DIFRANCESCO, D.; DUCOURET, P.; ROBINSON, R. B. Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. **Science**, v. 243, n. 4891, p. 669-672, 1989.

DONG, D.; BAI, Y.; CAI, B. Calcium-activated potassium channels: potential target for cardiovascular diseases. In: **Advances in protein chemistry and structural biology**. Academic Press, 2016. p. 233-261.

DUBIN, D. Interpretação rápida do ECG: um curso programado. **Editora de Publicações Biomédicas-EPUB, Rio de Janeiro**, 1996.

FORTES, Luis Henrique Santos. **Efeito da ovariectomia sobre o balanço autonômico cardíaco de ratas submetidas à desnutrição proteica**. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas) Departamento de ciências biológicas da Universidade de ouro preto, 2010.

FREY, B.; HEGER, G.; MAYER, C.; KIEGLER, B.; STOHR, H.; STEURER, G. **Pacing and clinical electrophysiology**, v. 19, n. 11, p. 1882-1885, 1996.

GERMÁN-SALLÓ, Z.; GERMÁN-SALLÓ, M. Non-linear Methods in HRV Analysis. **Procedia Technology**, v. 22, p. 645-651, 2016.

GODOY, M.F.; TAKAKURA, I.T.; CORREA, P.R. Relevância da análise do comportamento dinâmico não-linear (Teoria do Caos) como elemento prognóstico de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica. **Arq Ciênc Saúde**, v. 12, n. 4, p. 167-171, 2005.

GOLDBERGER, A. L. Non-linear dynamics for clinicians: Chaos theory, fractals, and complexity at the bedside. **Lancet**, v. 347, p. 1312-1314, 1996.

GOLDSTEIN, D. S.; BENTHO, O.; PARK, M. Y.; SHARABI, Y. Low frequency power of heart rate variability is not a measure of cardiac sympathetic tone but may be a measure of modulation of cardiac autonomic outflows by baroreflexes. **Experimental physiology**, v. 96, n. 12, p. 1255-1261, 2011.

GONCALVES, J. A influência do sistema nervoso Autônomo na resposta inflamatória da sepsis. **Arq Med**, Porto , v. 28, n. 1, p. 08-17, fev. 2014.

HAENSEL, A.; MILLS, P. J.; NELESEN, R. A.; ZIEGLER, M. G.; DIMSDALE, J. E. The relationship between heart rate variability and inflammatory markers in cardiovascular diseases. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 10, p. 1305-1312, 2008.

HADASE, M.; AZUMA, A.; ZEN, K.; ASADA, S.; KAWASAKI, T.; KAMITANI, T.; MATSUBARA, H. Very low frequency power of heart rate variability is a powerful predictor of clinical prognosis in patients with congestive heart failure. **Circulation Journal**, v. 68, n. 4, p. 343-347, 2004.

HARRIS, W. S.; SCHOENFELD, C. D.; WEISSLER, A. M. Effects of adrenergic receptor activation and blockade on the systolic preejection period, heart rate, and arterial pressure in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 46, n. 11, p. 1704, 1967.

HEATHERS, J. A. Sympathovagal balance from heart rate variability: an obituary. **Experimental physiology**, v. 97, n. 4, p. 556-556, 2012.

HEATHERS, J. A Everything Hertz: methodological issues in short-term frequency-domain HRV. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

HOSHI, R. A., PASTRE, C. M., VANDERLEI, L. C. M., GODOY, M. F. Poincaré plot indexes of heart rate variability: relationships with other nonlinear variables. **Autonomic Neuroscience**, v. 177, n. 2, p. 271-274, 2013.

HOULE, M. S.; BILLMAN, G. E. Low-frequency component of the heart rate variability spectrum: a poor marker of sympathetic activity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 1, p. H215-H223, 1999.

IRIGOYEN, M. C. C.; KRIEGER, E. M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 9, p. 1213-1220, 1998.

JANOUSEK, O.; RONZHINA, M.; SCHEER, P.; NOVÁKOVÁ, M.; PROVAZNÍK, I.; KOLÁŘOVÁ, J. **Computing in Cardiology, 2010**. IEEE, 2010. p. 923-926.

JAPUNDZIC, N.; GRICHOIS, M. L.; ZITOUN, P.; LAUDE, D.; ELGHOZI, J. L. Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 30, n. 2, p. 91-100, 1990.

JOSE, A. D.; COLLISON, D. The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man. **Cardiovascular research**, v. 4, n. 2, p. 160-167, 1970.

JOSE, A. D.; TAYLOR, R. R. Autonomic blockade by propranolol and atropine to study intrinsic myocardial function in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 11, p. 2019, 1969.

KARASON, K.; MØLGAARD, H.; WIKSTRAND, J.; SJÖSTRÖM, L. Heart rate variability in obesity and the effect of weight loss. **The American journal of cardiology**, v. 83, n. 8, p. 1242-1247, 1999.

KONOPELSKI, P. UFNAL, M. Electrocardiography in rats: a comparison to human. **Physiological research**, v. 65, n. 5, p. 717, 2016.

KOPEL, L.; CARVALHO, R. T.; LAGE, S. G. Indicações de agentes inotrópicos na insuficiência Cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo (SOCESP), São Paulo: Atheneu**, v. 1, p. 68-75, 2004.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy Physiology**. Elsevier Health Sciences, 2009.

KRENEK, P.; KMECOVA, J.; KUCEROVA, D.; BAJUSZOVA, Z.; MUSIL, P.; GAZOVA, A.; KYSELOVIC, J. Isoproterenol-induced heart failure in the rat is associated with nitric oxide-dependent functional alterations of cardiac function. **European journal of heart failure**, v. 11, n. 2, p. 140-146, 2009.

KUDAT, H.; AKKAYA, V.; SOZEN, A. B.; SALMAN, S.; DEMIREL, S.; OZCAN, M.; GUVEN, O. Heart rate variability in diabetes patients. **Journal of international medical research**, v. 34, n. 3, p. 291-296, 2006.

KURTOGLU, E.; BALTA, S.; KARAKUS, Y.; YASAR, E.; CUGLAN, B.; KAPLAN, O.;

GOZUBUYUK, G. Ivabradine improves heart rate variability in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 103, n. 4, p. 308-314, 2014.

KUWAHARA, M.; YAYOU, K. I.; ISHII, K.; HASHIMOTO, S. I.; TSUBONE, H.; SUGANO, S. Power spectral analysis of heart rate variability as a new method for assessing autonomic activity in the rat. **Journal of electrocardiology**, v. 27, n. 4, p. 333-337, 1994.

LAKATTA, E. G.; VINOGRADOVA, T. M.; MALTSEV, V. A. The missing link in the mystery of normal automaticity of cardiac pacemaker cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1123, n. 1, p. 41-57, 2008.

LAMPERT, R.; ICKOVICS, J. R.; VISCOLI, C. J.; HORWITZ, R. I.; LEE, F. A. Effects of propranolol on recovery of heart rate variability following acute myocardial infarction and relation to outcome in the Beta-Blocker Heart Attack Trial. **American Journal of Cardiology**, v. 91, n. 2, p. 137-142, 2003.

LEOR-LIBRACH, R. J.; BOBROVSKY, B. Z.; ELIASH, S.; KAPLINSKY, E. A common origin of the very low frequency heart rate and blood pressure variability—a new insight into an old debate. **Autonomic Neuroscience: Basic and clinical**, v. 96, n. 2, p. 140-148, 2002.

LI, D.; CHIANG, A. Y.; CLAWSON, C. A.; MAIN, B. W.; LEISHMAN, D. J. Heartbeat dynamics in adrenergic blocker treated conscious beagle dogs. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 58, n. 2, p. 118-128, 2008.

LIBBY, P.; BONOW, R. O.; MANN, D. L.; ZIPES, D. P. **Braunwald Tratado de Doenças Cardiovascular**. Elsevier Brasil, 2010.

LOMBARDI, F.; STEIN, P. K. Origin of heart rate variability and turbulence: an appraisal of autonomic modulation of cardiovascular function. **Frontiers in physiology**, v. 2, 2011.

MÄKIKALLIO, T. H.; HØIBER, S.; KØBER, L.; TORP-PEDERSEN, C.; PENG, C. K.; GOLDBERGER, A. L., Trace Investigators. Fractal analysis of heart rate dynamics as a predictor of mortality in patients with depressed left ventricular function after acute myocardial infarction. **The American journal of cardiology**, v. 83, n. 6, p. 836-839, 1999.

MALLIANI, A.; LOMBARDI, F.; PAGANI, M. Power spectrum analysis of heart rate variability: a tool to explore neural regulatory mechanisms. **British heart journal**, v. 71, n. 1, p. 1, 1994.

MALPAS, S. C.; MALING, T. J. Heart-rate variability and cardiac autonomic function in diabetes. **Diabetes**, v. 39, n. 10, p. 1177-1181, 1990.

MANGIN, L.; SWYNGHEDAUW, B.; BENIS, A.; THIBAUT, N.; LEREBOURS, G.; CARRÉ, F. Relationships between heart rate and heart rate variability: study in conscious rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 32, n. 4, p. 601-607,

1998.

MANSIER, P.; CLAIRAMBAULT, J.; CHARLOTTE, N.; MÉDIGUE, C.; VERMEIREN, C.; LEPAPE, G.; SWYNGHEDAUW, B. Linear and non-linear analyses of heart rate variability: a minireview. **Cardiovascular Research**, v. 31, n. 3, p. 371-379, 1996.

MONFREDI, O.; LYASHKOV, A. E.; JOHNSEN, A. B.; INADA, S.; SCHNEIDER, H.; WANG, R.; ZHANG, H. Biophysical characterization of the underappreciated and important relationship between heart rate variability and heart rate. **Hypertension**, p. HYPERTENSIONAHA.114.03782, 2014.

MORAIS, E. S. B. **Estudo de Fractalidade e Evolução Dinâmica de Sistemas Complexos**. 2007. 84 f. Tese (Doutorado em Física da Matéria Condensada; Astrofísica e Cosmologia; Física da Ionosfera) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

MORAES, R. S.; FERLIN, E. L.; POLANCZYK, C. A.; ROHDE, L. E.; ZASLAVSKI, L.; GROSS, J. L.; RIBEIRO, J. P. Three-dimensional return map: a new tool for quantification of heart rate variability. **Autonomic Neuroscience**, v. 83, n. 1, p. 90-99, 2000.

MOSTARDA, C.; RODRIGUES, B.; MEDEIROS, A.; MOREIRA, E. D.; MORAES-SILVA, I. C.; BRUM, P. C.; IRIGOYEN, M. C. Baroreflex deficiency induces additional impairment of vagal tone, diastolic function and calcium handling proteins after myocardial infarction. **American journal of translational research**, v. 6, n. 3, p. 320, 2014.

MOSTARDA, C.; RODRIGUES, B.; VANE, M.; MOREIRA, E. D.; ROSA, K.; MORAES-SILVA, I. C.; IRIGOYEN, M. C. Autonomic impairment after myocardial infarction: role in cardiac remodelling and mortality. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 4, p. 447-452, 2010.

MOUROT, L.; BOUHADDI, M.; PERREY, S.; CAPPELLE, S.; HENRIET, M. T.; WOLF, J. P.; REGNARD, J. Decrease in heart rate variability with overtraining: assessment by the Poincare plot analysis. **Clinical physiology and functional imaging**, v. 24, n. 1, p. 10-18, 2004.

MUKHINA, I. V.; DVORNIKOV, A. V.; KAMAIDANOV, N. A. Variability of the rhythm of isolated rat heart. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 129, n. 5, p. 417-419, 2000.

NOLAN, J.; BATIN, P. D.; ANDREWS, R.; LINDSAY, S. J.; BROOKSBY, P.; MULLEN, M.; NEILSON, J. M. Prospective study of heart rate variability and mortality in chronic heart failure results of the United Kingdom heart failure evaluation and assessment of risk trial (UK-Heart). **Circulation**, v. 98, n. 15, p.1510-1516, 1998.

NOVAIS, L.D.; SAKABE, D.I.; TAKAHASHI, A.C.M.; GONGORA, H.; TACIRO, C.; MARTINS, L.E.B. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em repouso de homens saudáveis sedentários e de hipertensos e coronariopatas em treinamento físico. **Rev Bras Fisioter**, v. 8, n. 3, p. 207-213, 2004.

OSTINI, F. M.; ANTONIAZZI, P.; PAZIN FILHO, A.; BESTETTI, R.; CARDOSO, M. C. M.; BASILE-FILHO, A. O uso de drogas vasoativas em terapia intensiva. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 31, n. 3, p. 400-411, 1998.

PAGANI, M.; LUCINI, D.; RIMOLDI, O.; FURLAN, R.; PIAZZA, S.; PORTA, A.; MALLIANI, A. Low and high frequency components of blood pressure variability. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 783, n. 1, p. 10-23, 1996.

PAPAIIOANNOU, V.; O VERKERK, A.; S AMIN, A.; BAKKER, J. Intracardiac origin of heart rate variability, pacemaker funny current and their possible association with critical illness. **Current cardiology reviews**, v. 9, n. 1, p. 82-96, 2013.

PICHOT, V.; BUSO, T.; ROCHE, F.; GARET, M.; COSTES, F.; DUVERNEY, D.; BARTHÉLÉMY, J. C. Autonomic adaptations to intensive and overload training periods: a laboratory study. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 34, n. 10, p. 1660-1666, 2002.

POLANCZYK, C. A.; ROHDE, L. E.; MORAES, R. S.; FERLIN, E. L.; LEITE, C.; RIBEIRO, J. P. Sympathetic nervous system representation in time and frequency domain indices of heart rate variability. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 79, n. 1, p. 69-73, 1998.

POMERANZ, B.; MACAULAY, R. J.; CAUDILL, M. A.; KUTZ, I.; ADAM, D.; GORDON, D.; COHEN, R. J. Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 248, n. 1, p. H151-H153, 1985.

PUMPRLA, J.; HOWORKA, K.; GROVES, D.; CHESTER, M.; NOLAN, J. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **Int J Cardiol**, v. 84, n.1, p. 1-14, 2002.

RAMAEKERS, D.; ECTOR, H.; VANHAECKE, J.; CLEEMPUT, J.; WERF, F. Heart rate variability after cardiac transplantation in humans. **Pacing and clinical electrophysiology**, v. 19, n. 12, p. 2112-2199, 1996.

RASSI JR, A. Compreendendo melhor as medidas de análise da variabilidade da frequência cardíaca. **J Diag Cardiol**, v. 8, 2000.

RIBEIRO, J.P.; MORAES FILHO, R.S. Variabilidade da frequência cardíaca como instrumento de investigação do sistema nervoso autônomo. **Rev. Bras. Hipertens**, v. 12, n. 1, p. 14-20, 2005.

RONZHINA, M.; JANOUSEK, O.; SCHEER, P.; NOVÁKOVÁ, M.; PROVAZNIK, I.; KOLÁROVÁ, J. Determination of the frequency bands for heart rate variability: studies on the intact and isolated rabbit hearts. **Computing in Cardiology**, v. 37, p. 927-930, 2010.

ROQUE, A. L.; VALENTI, V. E.; MASSETTI, T.; DA SILVA, T. D.; DE MELLO

MONTEIRO, C. B.; OLIVEIRA, F. R.; GRANJA FILHO, L. G. Chronic obstructive pulmonary disease and heart rate variability: a literature update. **International archives of medicine**, v. 7, n. 1, p. 43, 2014.

SACHA, J. Heart rate contribution to the clinical value of heart rate variability. **Kardiol. Pol**, v.72, n.10, p.919-924, 2014.

SACHA, J.; PLUTA, W. Alterations of an average heart rate change heart rate variability due to mathematical reasons. **International journal of cardiology**, v.128, n.3, p444-447, 2008.

SACHA, J.; PLUTA, W. Different methods of heart rate variability analysis reveal different correlations of heart rate variability spectrum with average heart rate. **Journal of electrocardiology**, v.38, n.1 p.47-53, 2005.

SAUL, J.P. Beat-to- beat variations of heart rate reflect modulation of cardiac autonomic outflow. *News Physiol Sci*, v. 5, p. 32–37, 1990

SANTOS, A. R. M. **Determinação da sensibilidade do barorreflexo na estratificação de risco de eventos arritmicos na doença de Chagas**. 104f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010.

SCHROEDER, E. B.; CHAMBLESS, L. E.; LIAO, D.; PRINEAS, R. J., EVANS, G. W., ROSAMOND, W. D.; HEISS, G. Diabetes, glucose, insulin, and heart rate variability. **Diabetes care**, v. 28, n. 3, p. 668-674, 2005.

SEVERS, N. J. Pathophysiology of gap junctions in heart disease. **Journal of cardiovascular electrophysiology**, v. 5, n. 5, p. 462-475, 1994.

SILVA, K. M. P **Avaliação do Nível Basal e do Controle Barorreflexo da Atividade do Sistema Nervoso Simpático da Prole de Ratos que Sofreram Desnutrição Proteica Durante a Gestação e a Lactação**. 156f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. Artmed editora, 2010.

DA SILVA, A. G. C. B.; ARAUJO, D. N.; COSTA, A. C. M.; DIAS, B. A. L.; DE FREITAS FREGONEZI, G. A.; DIAS, F. A. L. Increase in perceived stress is correlated to lower heart rate variability in healthy young subjects. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 37, n. 1, p. 7, 2015.

SILVA, F. C.; PAIVA, F. A.; M LLER-RIBEIRO, F. C.; CALDEIRA, H. M.; FONTES, M. A.; DE MENEZES, R. C.; MONTANO, N. Chronic treatment with ivabradine does not affect cardiovascular autonomic control in rats. **Frontiers in physiology**, v. 7, 2016.

SKRZYPIEC-SPRING, M.; GROTHUS, B.; SZEL G, A.; SCHULZ, R. Isolated heart

perfusion according to Langendorff—still viable in the new millennium. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 55, n. 2, p. 113-126, 2007.

SLEIGHT, P.; LA ROVERE, M. T.; MORTARA, A.; PINNA, G.; MAESTRI, R.; LEUZZI, S.; BERNARDI, L. Physiology and pathophysiology of heart rate and blood pressure variability in humans: is power spectral analysis largely an index of baroreflex gain?. **Clinical science**, v. 88, n. 1, p. 103-109, 1995.

STAUSS, H. M. Heart rate variability. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 5, p. R927-R931, 2003.

STEIN, P. K.; DOMITROVICH, P. P.; HUI, N.; RAUTAHARJU, P.; GOTTDIENER, J. Sometimes higher heart rate variability is not better heart rate variability: results of graphical and nonlinear analyses. **Journal of cardiovascular electrophysiology**, v. 16, n. 9, p. 954-959, 2005.

STEIN, P. K.; REDDY, A. Non-linear heart rate variability and risk stratification in cardiovascular disease. **Indian pacing and electrophysiology journal**, v. 5, n. 3, p. 210, 2005.

STEIN, P. K.; BOSNER, M. S.; KLEIGER, R. E., Conger, B. M. Heart rate variability: a measure of cardiac autonomic tone. **American heart journal**, v. 127, n. 5, p. 1376-1381, 1994.

SUTHERLAND, F. J.; HEARSE, D. J. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 6, p. 613-627, 2000.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. HEART RATE VARIABILITY: STANDARDS OF MEASUREMENT, PHYSIOLOGICAL INTERPRETATION AND CLINICAL USE. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043-1065, 1996.

TAYLOR, J. A.; CARR, D. L.; MYERS, C. W.; ECKBERG, D. L. Mechanisms underlying very-low-frequency RR-interval oscillations in humans. **Circulation**, v. 98, n. 6, p. 547-555, 1998.

THAYER, J. F.; ÅHS, F.; FREDRIKSON, M.; SOLLERS, J. J.; WAGER, T. D. A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: implications for heart rate variability as a marker of stress and health. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 2, p. 747-756, 2012.

Tsuji, H.; Venditti, F. J.; Manders, E. S.; Evans, J. C.; Larson, M. G.; Feldman, C. L.; Levy, D. Determinants of heart rate variability. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 28, n. 6, p. 1539-1546, 1996.

USUI, H.; NISHIDA, Y. The very low-frequency band of heart rate variability represents the slow recovery component after a mental stress task. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0182611, 2017.

VALENTI, V. E.; FERREIRA, C.; MENEHINI, A.; FERREIRA, M.; MURAD, N.; FERREIRA FILHO, C.; COLOMBARI, E. Avaliação da função barorreflexa em ratos jovens espontaneamente hipertensos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2009.

VANDERLEI, L.C.M.; PASTRE, C.M.; HOSHI, R.A.; CARVALHO, T.D.; GODOY, M.F. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 2, p.205-217, 2009.

WACHTER, S. B.; MCCANDLESS, S. P.; GILBERT, E. M.; STODDARD, G. J.; KFOURY, A. G.; REID, B. B.; MCCREATH, L. Elevated resting heart rate in heart transplant recipients: innocent bystander or adverse prognostic indicator?. **Clinical transplantation**, v. 29, n. 9, p. 829-834, 2015.

WATANABE, H.; MURAKAMI, M.; OHBA, T.; TAKAHASHI, Y.; ITO, H. TRP channel and cardiovascular disease. **Pharmacology & therapeutics**, v. 118, n. 3, p. 337-351, 2008.

WHALEN, E. J.; LEWIS, S. J. In vivo evidence that isoproterenol may increase heart rate in the rat by mechanisms in addition to activation of cardiac β_1 -or β_2 -adrenoceptors. **European journal of pharmacology**, v. 382, n. 3, p. 207-210, 1999.

WILLIAMS, S.; BOOTON, T.; WATSON, M.; ROWLAND, D.; ALTINI, M. Heart Rate Variability is a Moderating Factor in the Workload-Injury Relationship of Competitive CrossFit Athletes. **Journal of Sports Science and Medicine**, 2017.

XU, X.; VYSOTSKAYA, Z. V.; LIU, Q.; ZHOU, L. Structural basis for the cAMP-dependent gating in the human HCN4 channel. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 47, p. 37082-37091, 2010.

YANG, C. F.; CHEN, M. Y. C.; CHEN, T. I.; CHENG, C. F. Dose-dependent effects of isoflurane on cardiovascular function in rats. **Tzu Chi Medical Journal**, v. 26, n. 3, p. 119-122, 2014.

YANIV, Y.; LYASHKOV, A. E.; LAKATTA, E. G. Impaired signaling intrinsic to sinoatrial node pacemaker cells affects heart rate variability during cardiac disease. **Journal of clinical trials**, v. 4, n. 1, 2014.

YERAGANI, V. K.; POHL, R.; JAMPALA, V. C.; BALON, R.; KAY, J.; IGEL, G. Effect of posture and isoproterenol on QT variability in normal controls. In: **BIOLOGICAL PSYCHIATRY**. 655 AVENUE OF THE AMERICAS, NEW YORK, NY 10010 USA: ELSEVIER SCIENCE INC, 1999. p. 69S-69S.

APENDICE 1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA *IN VIVO*

TABELA 1 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DO TEMPO

	HR	SDNN	RMSSD
Controle	393,59 (57,44)	7,036 (3,342)	2,574 (1,846)
Sal	406,15 (62,87)	6,408 (5,009)	2,324 (1,588)
Valor p	0,433	0,737	0,970
Controle	433,20 ± 39,36	7,314 ± 2,24	2,579 ± 1,279
Atr	468,79 ± 31,21	3,126 ± 1,193	0,548 ± 0,220
Valor p	0,002	<0,001	<0,001
Controle	426,11 ± 31,98	7,179 (3,028)	2,451 ± 1,202
Prop	339,01 ± 17,48	3,738 (1,605)	2,030 ± 0,973
Valor p	<0,001	0,002	0,051
Controle	409,08 ± 35,39	7,052 (3,355)	2,870 (1,882)
A+P	380,07 ± 20,18	1,379 (1,217)	0,666 (0,558)
Valor p	0,001	<0,001	<0,001
Controle	420,08 ± 33,77	6,537 (3,448)	2,785 (1,866)
Valor p	502,07 ± 14,96	1,719 (0,762)	0,756 (0,519)
Iso	<0,001	<0,001	<0,001
Controle	399,28 ± 37,39	7,220 ± 2,192	3,588 ± 1,446
Iva	278,15 ± 34,55	7,611 ± 1,891	4,999 ± 1,356
Valor p	<0,001	0,522	0,006

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Salina (sal), Atropina (Atro), propranolol (Prop), atropine e propranolol (A+P), isoproterenol (Iso), ivabradina (Iva). Os dados paramétricos estão expressos como média±desvio padrão, e os dados não paramétricos como mediana (amplitude interquartis).

TABELA 2 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

	VLF	LF	HF	LF/HF	LFnu	HFnu
Controle	33,17± 20,52	3,944± 3,245	2,079 (3,145)	1,257 (1,260)	55,47 ± 13,80	44,52 ± 13,80
Sal	32,29 ±23,36	2,825 ±2,037	2,334 (3,350)	1,118 (0,587)	52,77 ± 11,17	47,47 ± 11,40
Valor p	0,821	0,061	0,709	0,370	0,527	0,496
Controle	31,90 (40,08)	2,911 (2,178)	2,032 (1,612)	1,364 (1,123)	58,14± 12,89	41,85 ± 12,89
Atro	6,09 (11,13)	0,174 (0,178)	0,127 (0,149)	1,599 (2,625)	65,21± 16,09	34,75 ± 16,08
Valor p	<0,001	<0,001	<0,001	0,117	0,144	0,142
Controle	30,44 (31,95)	2,242 (2,802)	1,698 (1,980)	1,810± 0,936	60,85 ± 11,96	39,14 ± 11,96
Prop	9,91 (12,01)	0,784 (1,757)	0,985 (1,856)	0,883± 0,243	46,01 ± 7,50	53,98 ± 7,50
Valor p	0,002	0,001	0,033	<0,001	<0,001	<0,001
Controle	33,36 (41,07)	4,43 (6,11)	3,146 (4,182)	1,264 (1,038)	57,38 ± 11,59	42,63 ± 11,57
A+P	1,047 (3,639)	0,165 (0,241)	0,105 (0,260)	1,168 (1,826)	52,38 ± 18,51	46,12 ± 19,37
Valor p	<0,001	<0,001	<0,001	0,709	0,291	0,477
CONTROL	30,28 (32,65)	3,553 (5,423)	2,925 (3,389)	1,432 (0,912)	58,79 (15,82)	41,19 (15,84)
Iso	0,707 (0,876)	0,251 (0,332)	0,226 (0,235)	0,737 (1,581)	42,36 (40,72)	57,62 (40,71)
Valor p	<0,001	<0,001	<0,001	0,021	0,006	0,006
Controle	34,13 (60,64)	5,39 (6,07)	4,042 (5,591)	1,493 (1,994)	56,99 ± 17,07	43,00 ± 17,06
Iva	29,38 (46,93)	7,34 (7,59)	5,066 (5,175)	1,027 (0,774)	52,61 ± 10,50	47,38 ± 10,50
Valor p	0,777	0,647	0,199	0,071	0,363	0,362

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Salina (sal),Atropina (Atro), propanolol (Prop), atropine e propranolol (A+P), isoproterenol (Iso), ivabradina (Iva). Os dados paramétricos estão expressos como média±desvio padrão, e os dados não paramétricos como mediana (amplitude interquartis).

TABELA 3 - ANÁLISE NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA QUANDO TOTAL POWER É CONSIDERADO

	% VLF	% LF	% HF
Controle	83,39 ± 13,64	8,94 ± 5,74	7,67 ± 8,18
Atropina	95,340 ± 4,027	2,658 ± 2,057	2,003 ± 2,230
Valor p	0,001	<0,001	0,009
Controle	84,76 ± 12,50	8,61 ± 6,20	6,63 ± 6,97
Propranolol	81,18 ± 15,90	8,55 ± 6,48	10,27 ± 9,71
Valor p	0,393	0,975	0,143
Controle	82,90 - 8,78	9,82 - 5,16	7,28 - 4,55
Isoproterenol	50,22 - 26,06	21,75 - 13,17	28,03 - 19,74
Valor p	<0,001	0,003	<0,001
Controle	80,71 ± 12,70	11,34 ± 7,68	7,95 ± 6,40
Atrop+prop	78,18 ± 14,59	11,28 ± 9,03	10,54 ± 9,85
Valor p	0,500	0,982	0,287

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Salina (sal), Atropina (Atro), propranolol (Prop), atropine e propranolol (A+P), isoproterenol (Iso), ivabradina (Iva). Os dados paramétricos estão expressos como média ± desvio padrão, e os dados não paramétricos como mediana (amplitude interquartil).

TABELA 4 - ANÁLISE NÃO LINEAR DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

	SD1	SD2	SD2/SD1	SamEn	DFAa1	DFAa2
Controle	1,820 (1,306)	9,650 (4,829)	4,636 (1,699)	1,232 ± 0,280	0,999 ± 0,143	1,254 ± 0,165
Sal	1,643 (1,123)	8,872 (6,742)	4,623 (2,038)	1,195 ± 0,358	0,999 ± 0,184	1,316 ± 0,159
Valor p	0,970	0,737	0,794	0,653	0,992	0,106
Controle	1,824 ± 0,905	10,139±3,181	6,693±3,227	1,064 ±0,435	1,075±0,204	1,289 ± 0,129
Atr	0,387 ± 0,155	4,399±1,694	12,81 ± 5,83	0,628 ±0,319	1,234±0,302	1,521 ± 0,138
Valor p	<0,001	<0,001	0,001	0,002	0,088	<0,001
Controle	1,733 ± 0,850	10,050 (4,290)	5,683 (3,624)	1,062 ± 0,359	1,095 ± 0,164	1,346 - 0,191
Prop	1,436 ± 0,688	5,015 (2,486)	4,332 (2,238)	1,288 ± 0,413	0,893 ± 0,138	1,249 - 0,132
Valor p	0,052	0,003	0,008	0,050	<0,001	0,023
Controle	2,064 (1,401)	9,742 (4,769)	4,198 (2,158)	1,247 ± 0,319	1,041 ± 0,198	1,273 ± 0,132
A+P	0,471 (0,394)	1,914 (1,653)	4,532 (2,399)	1,238 ± 0,372	1,028 ± 0,285	1,243 ± 0,216
Valor p	<0,001	<0,001	0,881	0,938	0,863	0,607
Controle	1,969 (1,320)	9,379±3,460	4,996 (1,460)	1,142±0,318	1,063±0,154	1,297±0,125
Isopr	0,535 (0,367)	2,205±0,832	3,449 (3,160)	1,345±0,357	0,913±0,260	0,657±0,171
Valor p	<0,001	<0,001	0,044	0,033	0,016	<0,001
Controle	2,489 (1,814)	9,859 ± 3,033	4,219 ± 1,233	1,202± 0,358	1,020 ± 0,201	1,178 ± 0,130
Iva	3,800 (1,320)	10,352 ± 3,00	2,955 ± 1,111	1,624 ±0,321	0,819 ± 0,100	1,211 ± 0,112
Valor p	0,005	0,557	<0,001	0,001	0,001	0,297

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Salina (sal), Atropina (Atro), propanolol (Prop), atropine e propanolol (A+P), isoproterenol (Iso), ivabradina (Iva). Os dados paramétricos estão expressos como média±desvio padrão, e os dados não paramétricos como mediana (amplitude interquartis).

APENDICE 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA CORAÇÃO ISOLADO

TABELA 5 - ANÁLISE DA VFC DO CORAÇÃO ISOLADO NO DOMÍNIO DO TEMPO

	HR	SDNN	RMSSD
In vivo	434,36 ± 36,60	7,665 ± 2,265	2,976 ± 0,931
Isolado	164,46 ± 13,84	5,266 ± 1,592	2,297 ± 1,112
Valor p	<0,001	0,001	0,038
Controle	166,99 ± 18,30	5,37 ± 1,51	2,246 ± 0,944
Isoproterenol	251,10 ± 26,90	14,05 ± 7,78	1,985 ± 1,385
Valor p	<0,001	<0,001	0,484

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Salina (sal), Atropina (Atro), propranolol (Prop), atropine e propranolol (A+P), isoproterenol (Iso), ivabradina (Iva). Os dados estão expressos como média±desvio padrão.

TABELA 6 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA DO CORAÇÃO ISOLADO NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

	VLF	LF	HF	LF/HF	LFnu	HFnu
In vivo	38,97 ± 22,23	3,62 (5,89)	3,001 -2,622	1,209 (1,187)	57,19 ± 13,23	42,80 ± 13,22
Isolado	22,01 ± 16,42	2,076 (2,974)	0,254 -0,447	7,36 (11,28)	86,56 ± 7,59	13,44 ± 7,59
P-valeu	0,021	0,044	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Controle	17,49 (26,43)	2,161 (2,327)	0,254 (0,400)	9,18 ± 6,21	88,47 (15,34)	11,54 (15,34)
Isoprot	79,0 (124,7)	1,045 (2,528)	0,402 (0,967)	3,428 ±1,852	75,84 (15,81)	24,16 (15,81)
Valor p	0,007	0,109	0,501	0,003	0,002	0,002

FONTE: O autor (2018)

TABELA 7 - ANÁLISE NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA ONDE AS VARIÁVEIS SÃO EXPRESSAS COM RELAÇÃO AO TOTAL POWER

	VLF	LF	HF
In vivo	79,87 ± 12,38	12,34 ± 9,56	7,790 ± 4,305
Isolado	84,70 ± 12,64	13,09 ± 10,81	2,201 ± 2,259
Valor p	0,209	0,798	<0,001
Isolado	87,60 (17,34)	10,06 (16,53)	2,127 ± 2,473
Isoproterenol	97,90 (11,94)	1,72 (8,23)	2,094 ± 3,223
Valor p	0,020	0,017	0,714

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Salina (sal),Atropina (Atro), propanolol (Prop), atropine e propranolol (A+P), isoproterenol (Iso), ivabradina (Iva). Os dados paramétricos estão expressos como média±desvio padrão, e os dados não paramétricos como mediana (amplitude interquartis).

TABELA 8 - ANÁLISE NÃO LINEAR DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA DO CORAÇÃO ISOLADO

	SD1	SD2	SD2/SD1	SamEn	DFAa1	DFAa2
In vivo	2,105 ± 0,658	10,611 ± 3,210	4,900 (3,022)	1,148 ± 0,229	1,083 ± 0,151	1,298 ± 0,152
isolado	1,634 ± 0,787	7,214 ± 2,305	4,550 (3,763)	1,167 ± 0,431	1,163 ± 0,308	1,154 ± 0,185
	0,040	0,001	0,881	0,850	0,314	0,020
Contr	1,600 ± 0,669	7,387 ± 2,210	4,385 (4,039)	1,257 (0,717)	1,166 ± 0,303	1,201 ± 0,162
isoprot	1,405 ± 0,979	19,73 ± 11,02	13,47 (30,31)	0,211 (0,783)	1,284 ± 0,327	1,429± 0,426
	0,465	<0,001	0,004	0,002	0,297	0,008

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Salina (sal), Atropina (Atro), propanolol (Prop), atropine e propranolol (A+P), isoproterenol (Iso), ivabradina (Iva). Os dados paramétricos estão expressos como média±desvio padrão, e os dados não paramétricos como mediana (amplitude interquartis).

APENDICE 3 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1017

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.148941/2016-21

APROVADO/APPROVAL: 08/11/2016 – R.O. 10/2016

TÍTULO: Determinação dos componentes simpático e parassimpático das bandas espectrais da variabilidade da frequência cardíaca: Proposta de correção de ruídos através do uso do coração isolado.

TITLE: Determination of the sympathetic and parasympathetic of the frequency bands of spectral analysis of heart rate variability: noise correction proposal through the use of the isolated heart.

AUTORES/AUTHORS: Fernando Augusto Lavezzo Dias, Carlos Henrique Pereira, Eduardo Gomes de Sousa Neto, Andrielle Elaine Capote, Rosalvo T. H. Fogaça.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia


Prof. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Coordenadora da CEUA